

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR - INGENIEUR

par

Saleh ABOUKHEIR

SUJET :

**Activité des levures
dans les denrées alimentaires
à base de viande**

Soutenue publiquement le 3 décembre 1975 devant la Commission d'Examen

JURY :

MM. F. MANGENOT	Président
P. GADAL	Examineurs
G. KILBERTUS	
M. AUBERT	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547402_0009

REMERCIEMENTS

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR - INGENIEUR

par

Saleh ABOUKHEIR

SUJET :

**Activité des levures
dans les denrées alimentaires
à base de viande**

Soutenue publiquement le 3 décembre 1975 devant la Commission d'Examen

JURY :

MM. F. MANGENOT	Président
P. GADAL	} Examineurs
G. KILBERTUS	
M. AUBERT	

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR - INGENIEUR

par

Saleh ABOUKHEIR

SUJET :

Activité des levures
dans les denrées alimentaires
à base de viande



Soutenue publiquement le 3 décembre 1975 devant la Commission d'Examen

JURY :

M. F. MANOCHET
R. GAGNE
O. KLEIN
M. ABELT
Président
Rapporteur
Examinateur

REMERCIEMENTS

AVANT PROPOS

Avant d'exposer les résultats de mes recherches, qu'il me soit permis d'exprimer mes sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui, de près ou de loin, se sont intéressées à ce travail et m'ont permis de le mener à bien.

Si ce travail a été effectué à l'Université de Nancy I, c'est grâce à Monsieur le Professeur MANGENOT qui m'a accueilli avec bienveillance dans son laboratoire. Malgré ses nombreuses occupations, il n'a cessé de m'encourager et je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance.

Je tiens également à exprimer mes sentiments de très grande reconnaissance à Monsieur KILBERTUS à qui je dois l'orientation de mes recherches et leur aboutissement. Ses conseils et ses encouragements tout au long de ce travail ont été pour moi un puissant stimulant. C'est pourquoi je suis heureux de lui exprimer publiquement mes respectueux et très sincères remerciements.

Malgré ses nombreuses obligations, Monsieur GADAL a bien voulu accepter d'être présent à ma soutenance. Ses conseils m'ont été précieux en particulier pour l'analyse de certains résultats expérimentaux. Je tiens à lui renouveler mes sincères remerciements pour l'aide qu'il m'a apportée.

J'adresse mes remerciements à Monsieur AUBERT, Directeur technique des Etablissements DESVIGNES, d'avoir bien voulu faire partie du jury de cette thèse.

Monsieur MOUREY n'a jamais cessé de m'aider au cours de ce travail, qu'il en soit amicalement remercié.

A Monsieur REISINGER et Madame DELON et à tous mes camarades de laboratoire, j'exprime mes remerciements.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidé et facilité mon séjour en France pour réaliser ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	I
CHAPITRE I. RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES LEVURES DANS LA VIANDE ET LES PRODUITS A BASE DE VIANDE.....	4
Matériel et Méthodes.....	5
I. Milieux de culture.....	5
a) Levures.....	5
b) Germes mésophiles et psychrotrophes.....	5
c) Bactéries coliformes et identification d' <u>Escherichia coli</u>	6
d) Streptocoques fécaux.....	6
e) Staphylocoques pathogènes.....	6
f) Salmonelles.....	7
g) Clostridia sulfito-réducteurs.....	7
II. Identification des levures.....	8
a) Morphologie et caractères de la multiplication végétative.....	8
b) Formation des ascospores.....	9
c) Fermentation des sucres.....	9
d) Assimilation des sucres.....	9
e) Assimilation des nitrates.....	9
f) Formation de pigments.....	10
Résultats	
I. Analyses.....	10
II. Levures identifiées.....	11
a) <u>Endomycetaceae</u>	11
b) <u>Cryptococcaceae</u>	15
III. Observation de la surface de quelques denrées alimentaires au microscope électronique à balayage.....	16
Conclusions.....	18

CHAPITRE II. PENETRATION DES LEVURES DANS LA VIANDE.....	26
1. DEPOT DES LEVURES SUR LES BLOCS DE VIANDE.....	29
Matériel et méthodes.....	29
Résultats.....	30
2. UTILISATION DU ^{14}C	31
Matériel et méthodes.....	31
a) Préparation des levures.....	31
b) Culture sur éléments marqués.....	32
Résultats.....	35
3. OBSERVATIONS A L'AIDE DES MICROSCOPES ELECTRONIQUES.....	36
Matériel et méthodes.....	37
Résultats.....	37
a) Témoins.....	37
b) Modifications ultrastructurales des fibrilles.....	38
c) Activité des microorganismes.....	41
CONCLUSIONS.....	43
CHAPITRE III. ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES LEVURES.....	57
Materiel et méthodes.....	59
I. Microorganismes.....	59
II. Milieux de culture.....	60
a) Milieu à base de caséine.....	60
b) Milieu à base de poudre acétonique de viande.....	60
c) Milieu à base de gélatine.....	61
III. Incubation et lecture des résultats.....	61
Résultats.....	62
I. Hydrolyse de la caséine.....	62
a) Température ambiante.....	62
b) 5°C.....	62
II. Hydrolyse de la poudre acétonique de viande.....	62
a) Température ambiante.....	62
b) 5°C.....	63
III. Hydrolyse de la gélatine.....	63
a) Température ambiante.....	63
b) 5°C.....	64
Conclusions.....	64

CHAPITRE IV. ACTIVITE LIPOLYTIQUE DES LEVURES.....	69
Matériel et méthodes.....	73
I. Microorganismes.....	73
II. Milieux de culture.....	73
a) Tweens.....	73
b) Tributyrine.....	74
III. Technique de culture.....	74
Résultats	
I. Tween 20 (Ester mono-laurique $C_{11}H_{23}COOR$).....	75
a) Température ambiante.....	75
b) 5°C.....	76
II. Tween 40 (Ester mono-palmitique $C_{15}H_{31}COOR$).....	76
a) Température ambiante.....	76
b) 5°C.....	76
III. Tween 60 (Ester mono-stéarique $C_{17}H_{35}COOR$).....	76
IV. Tween 80 (Ester mono-oleique $C_{17}H_{33}COOR$).....	76
V. Tween 85.....	77
VI. Tributyrine.....	78
a) Température ambiante.....	78
b) 5°C.....	78
Conclusions.....	79
CHAPITRE V. INTERACTION BACTERIES - LEVURES.....	88
Matériel et méthodes.....	89
I. Milieux de culture.....	89
a) Milieu de Rothe.....	89
b) Milieu de Litsky.....	90
c) Milieu à la bile et au vert brillant.....	90
II. Conditions de culture.....	90
Résultats.....	91
I. <u>Candida melinii</u>	91
a) Action sur les Streptocoques.....	91
b) Action sur les Coliformes.....	91
II. <u>Rhodotorula mucilaginosa</u>	93
a) Action sur les Streptocoques	93

b) Action sur les Coliformes.....	93
Conclusions.....	93
CONCLUSIONS.....	95
RESUME.....	98
موجز :.....	101
BIBLIOGRAPHIE.....	102

INTRODUCTION

Les levures sont très abondantes sur les produits carnés. Leur origine est diverse. Elles peuvent provenir de la peau, des poils et du tube digestif des animaux. Bien que n'étant pas prédominantes, on les rencontre encore sur les produits alimentaires à base de viande conservés au réfrigérateur (WALKER et AYRES 1970, JAY 1972). Leur nombre s'accroît considérablement après un traitement des viandes à l'aide de radiations ou de chlortetracyclines (TARR et al 1952, EKLUND et al 1965). Ces levures appartiennent en majorité aux genres Torulopsis, Candida et Rhodotorula.

Cette flore se diversifie dans les viandes de volaille et en plus des genres précédents on retrouve souvent des Saccharomyces (WELLS et STADELMAN 1958).

Au cours de la fabrication des saucisses et produits similaires, le nombre des levures peut augmenter, soit lors de l'addition de certains ingrédients, soit par contamination d'origine atmosphérique ou humaine. En effet, selon KRISHNASWAMY et al (1971) ces champignons sont toujours présents dans les épices (jusqu'à 10.000/g). Dans les olives on rencontre de nombreuses espèces de Pichia, Mycoderma, Candida, Torulopsis, Hansenula et Debaryomyces. (MRAK et BONAR 1939, MRAK et al 1956).

L'atmosphère contient aussi un nombre élevé de ces microorganismes issus en particulier de la phyllosphère des plantes, les espaces clos et les ateliers permettant une concentration plus importante. C'est ainsi que sur les feuilles d'orge, RODRIGUES DE MIRANDA et DIEM (1974) signalent des Candida. Le poids de ces germes, dont la plupart sont doués d'une nette activité lipolytique, pourrait atteindre 1% du poids du feuillage (MANGENOT 1966).

Enfin dans les sécrétions lipidiques de la peau, en particulier sur la tête, on retrouve de nombreuses levures lipolytiques.

Ces origines très diverses se traduisent par une flore variée dans les produits transformés. MRAK et BONAR en 1939, ont ainsi isolé Debaryomyces hansenii à partir de saucisses. DRAKE et al

(1959) ont mis en évidence de nombreuses espèces de Debaryomyces , Candida, Torulopsis et Trichosporon. Dans les saucisses de Francfort, REUTER (1972) a signalé la présence de Candida , Torulopsis, Rhodotorula, Trichosporon, Saccharomyces et Hansenula. Ces microorganismes sont remplacés par des moisissures lorsque la denrée alimentaire se déshydrate. L'addition d'amidon dans les produits carnés conservés sous plastique favorise l'activité d'une flore glucidolytique acidogène, ce qui permet secondairement la prévalence des levures (PANTALEON et ROSSET 1966). Dans les denrées à base de viande, HADLOK (1972) a isolé des Debaryomyces, Candida, Torulopsis, Hansenula et Saccharomyces. Les espèces appartenant aux trois premiers genres peuvent résister, selon ces auteurs à des températures proches de -5°C , alors que les Saccharomyces survivent encore à -10°C . Ces germes produisent tous des lipases qui rancissent les aliments.

Enfin parmi toutes ces données bibliographiques qui ne se veut pas exhaustives, on peut aussi citer SCHICKELE (1971) qui lors d'une étude sur la qualité bactériologique des plats cuisinés, déclare que les levures et les moisissures sont responsables d'un grand nombre d'altérations et peuvent se développer à des températures comparables à celles permettant la croissance des germes psychrotrophes.

Fréquemment et en l'absence d'addition de levain, nous avons pu isoler ces microorganismes à partir de viande fraîche et de produits transformés. Bien que n'étant pas prédominantes, la multiplication des levures étant différente de celle des bactéries, nous considérons qu'il est hasardeux de leur accorder une importance moindre en se basant uniquement sur des caractères quantitatifs. C'est pourquoi, au cours du travail qui va suivre, nous allons rechercher leurs possibilités et leur mode d'action dans les produits à base de viande ainsi que dans les muscles d'animaux.

CHAPITRE I

RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES LEVURES DANS LA VIANDE ET LES PRODUITS A BASE DE VIANDE

La présence fréquente des levures dans les produits à base de viande nous a conduit, dans un premier temps, à rechercher et à déterminer ces germes dans différentes denrées alimentaires et à comparer leur nombre avec celui de certaines bactéries, en recherchant éventuellement une corrélation entre ces deux catégories de germes.

Ces eucaryotes ont été recherchés dans 40 produits à base de viande, provenant de différents magasins de Nancy (54) et des environs.

MATERIEL ET METHODES

Après avoir éliminé les parties externes susceptibles d'être contaminées par les manipulations et la flore atmosphérique, nous avons prélevé 10g de matériel que nous avons mis en suspension après broyage. Le mélange ainsi obtenu nous a servi, après dilution, à ensemencer une série de milieux de culture permettant la mise en évidence de germes particuliers.

I. MILIEUX DE CULTURE.

a) Levures

Elles ont été mises en évidence sur du malt gélosé (15g de malt, 15g de gélose) et sur OGA (glucose 20g, extrait de levure 5g, Gélose 20g pour 1 litre d'eau).

b) Germes mésophiles et psychrotrophes.

Le milieu utilisé est une gélose à la tryptone additionnée de 3% d'extrait de levure et de deux gouttes à 0,5% pour

20ml de gélose, de triphényltetrazolium. La recherche des germes mésophiles se fait à 30°C pendant 48 heures et celle des microorganismes psychrotrophes à 10°C pendant 10 jours.

c) Bactéries coliformes et identification d'Escherichia coli.

La recherche a été effectuée à l'aide du bouillon à la bile et au vert brillant (Bile de boeuf déshydratée 20g, lactose 10g, peptone 10g, vert brillant 0,013g pour un litre d'eau, pH 7,2). Le test est positif si l'on observe du gaz dans la cloche de Durham (au moins 1/10).

On met en évidence E.coli en répétant cette expérience et en constatant la production d'indole (Milieu:trypticase 20g , phosphate disodique 2g, glucose 1g, gélose 1g, nitrate de potassium 1g pour un litre d'eau. Si, après incubation, on constate l'apparition d'un anneau rouge cerise après addition de quelques gouttes de réactif de Kowacz , le test est positif).

d) Streptocoques fécaux.

Cette recherche se fait en deux temps :

- test de présomption sur milieu de Rothe
- test de confirmation sur milieu de Litsky.

Le test de présomption est positif lorsque le milieu de Rothe se trouble (Composition du milieu de Rothe : tryptone 20g, glucose 5g, chlorure de sodium 5g, phosphate bipotassique 2,7g, phosphate monopotassique 2,7g, azothydrate de sodium 0,2g pH 6,8).

La présence de streptocoques est confirmée lorsque le milieu de Litsky se trouble et qu'on observe une pastille violette au fond du tube (Composition du milieu de Litsky : identique à celle du milieu de Rothe, mais on ajoute en plus 0,3g d'azothydrate de sodium et 5ml d'une solution à 0,01% de violet d'éthyle).

e) Staphylocoques pathogènes.

L'isolement et le dénombrement des staphylocoques pathogènes se fait sur le milieu de Baird Parker (Tryptone 10g, Extrait

de viande 5g, extrait de levure 1g, chlorure de lithium 5g, gélose 20g pour un litre d'eau. On ajoute 25ml d'une solution à 0,2% de sulfamézathine. Après dissolution, ramener à 50°C et ajouter 6ml de glycocolle à 20%, 1ml de tellurite de potassium à 1%, 5ml de pyruvate de sodium à 20%, 5ml d'une solution de jaune d'oeuf).

Les staphylocoques qui se développent sur ce milieu forment des colonies circulaires bombées, noires, entourées d'un halo d'éclaircissement du jaune d'oeuf de 2 à 5mm de diamètre et visible en 24 - 48 heures.

f) Salmonelles.

Après préenrichissement en bouillon ordinaire à double concentration, on ensemence un bouillon Sélénite F (Polypeptone 5g, lactose 4g, phosph⁵ate de sodium 10g, sélénite acide de sodium 4g pour un litre d'eau, pH 7).

Si l'on observe un développement on repique sur un milieu Désoxycholate citrate (Désoxycholate de sodium 2,5g, citrate de sodium 10,5g, lactose 5g, saccharose 5g, polypeptone 7g, extrait de viande 3g, thiosulfate de sodium 5g, rouge neutre 0,03g, gélose 12g pour un litre d'eau, pH 7,2. Laisser bouillir 1 à 2 minutes, ne pas autoclaver) .

g) Clostridia sulfito-réducteurs.

Ces bactéries ont été obtenues sur milieu de base VL (Peptone tryptique 10g, chlorure de sodium 5g, extrait de viande 2g, chlorydrate de cystéine 0,3g pour un litre d'eau, pH 7,4 - puis ajouter 15g de gélose et 2g de glucose). Après que ce milieu soit fondu, laisser refroidir à 45°C et ajouter dans chaque tube 20ml , 1ml d'une solution à 5% de sulfite de sodium (sulfite de sodium à teneur en SO₂ de 23%) et 4 gouttes d'une solution à 5% d'alun de fer.

II. IDENTIFICATION DES LEVURES

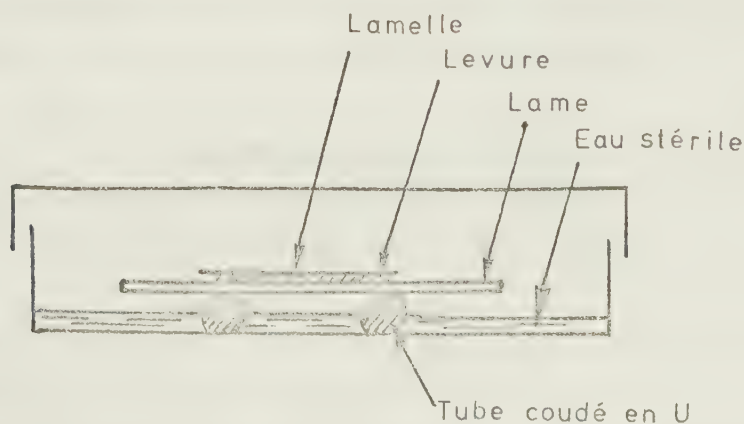
Nous avons utilisé la technique de BEECH et al (1968) que nous avons complétée à l'aide de la classification de LODDER (1971). Les principaux caractères d'identification sont les suivants :

a) Morphologie et caractères de la multiplication végétative.

Les différents isolats ont été repiqués sur Bacto Yeast Morphology Agar Difco. Durant deux semaines nous avons fait des prélèvements pour mettre en évidence la production éventuelle de pseudomycéliums, de mycéliums vrais, d'arthrospores, etc...

Nous avons aussi utilisé la culture sur lame. Sur une lame stérile on dépose une fine pellicule de yeast agar. On ensemence les levures en strie sur ce milieu et on recouvre le tout d'une lamelle préalablement passée à la flamme. Ces lames sont disposées dans des chambres humides (Figure I). Le tout est incubé à 25°C durant 4 jours. On répète périodiquement les observations en microscopie photonique afin de vérifier la morphologie et les caractères de multiplication végétative.

Figure I : Dispositif expérimental pour étudier la morphologie et les caractères de multiplication végétative des levures.



b) Formation des ascospores.

La mise en évidence de la formation d'asques et d'ascospores, critère taxonomique très important chez les levures a été réalisée sur milieu de FOWELL (1952). Après 3 jours sur ce milieu, à 25°C, on note la présence éventuelle de ces organes. Dans le cas de test négatif, les boîtes sont conservées et observées à intervalles réguliers pendant 4 semaines.

c) Fermentation des sucres.

Le milieu utilisé est celui proposé par WICKERHAM en 1951 (Difco Yeast Extract 4,5g, peptone 7,5g, bleu de bromothymol pour un litre d'eau, pH 6,4). Dans chaque tube contenant ce milieu ^{4 ml} on ajoute une cloche de Durham. La fermentation des sucres se traduit par un virement de la teinte du milieu avec éventuellement production de gaz à l'intérieur de la cloche.

Les sucres, stérilisés séparément sur filtres millipores, sont additionnés à raison ^{2 ml} de 6% pour le glucose, galactose, saccharose, maltose et lactose, à 8% pour le mélibiose et à 12% pour le raffinose.

d) Assimilation des sucres.

On utilise le milieu de WICKERHAM (1951) (Difco yeast nitrogen base 6,7% et 5% du sucre à tester). Les levures sont cultivées au préalable sur le même milieu ne contenant que 0,5% de sucre et cela pendant les quatre jours précédant l'expérience.

Le développement des germes traduit l'assimilation des sucres. Les mesures de la croissance sont effectuées toutes les semaines durant un mois à l'aide d'un néphélomètre Thorp.

e) Assimilation des nitrates.

On ajoute 0,5ml d'une solution stérile à 11,7% de Difco Carbon base et de 0,78% de nitrate de potassium à 4,5ml d'eau

stérile. On inocule un tube avec 0,2ml d'inoculum lavé et après 7 jours on inocule un deuxième tube à l'aide de 0,1ml du premier. Les mesures de turbidimétrie sont faites après 7 jours d'incubation (WICKERHAM 1946).

f) Formation de pigments.

Les levures colorées se développant sur le milieu d'assimilation du glucose sont séparées par centrifugation. Si le pigment est soluble dans l'acétone il s'agit de caroténoides et s'il est soluble dans l'éthanol avec 5% de KOH il correspond à de la pulcherrimine.

RESULTATS

I. ANALYSES (Tableau I)

Alors qu'aucun levain n'est utilisé au cours de leur fabrication, sur 40 produits analysés, plus de la moitié (22) contiennent des levures en nombre variable : de 20 à $1,2 \times 10^5/g$. Ces chiffres parfois très élevés, laissent supposer que ces microorganismes jouent un rôle non négligeable dans les produits à base de viande.

Ces germes apparaissent dans les échantillons étudiés lorsque le chiffre de la flore aérobie mésophile est supérieure à $10^6/g$ sauf dans un cas : celui de la terrine de viande (3400 levures pour 1730 germes aérobies mésophiles). Cette exception peut s'expliquer par l'addition d'un ingrédient spécial dans cette denrée : du porto, favorisant probablement le développement des champignons.

Une autre similitude : c'est la présence presque constante de coliformes dans les produits envahis par les levures. Ce résultat témoignerait en faveur d'une contamination ultérieure si ces deux

catégories de microorganismes n'étaient rencontrées dans le produit initial (viande de boeuf et de porc).

Il ne semble pas, à première vue, y avoir de corrélation entre la présence des levures et celle d'autres germes (streptocoques, staphylocoques, clostridia, salmonelles). Les comparaisons sont cependant délicates, car les résultats sont souvent négatifs.

L'identification des levures pourra apporter des données complémentaires à ces premiers résultats. En effet, si la composition qualitative de la flore n'est que peu diversifiée, on peut supposer qu'il y a une spécialisation et une sélection des champignons ayant des activités physiologiques similaires.

II. LEVURES IDENTIFIEES.

Nous avons appliqué les différents tests d'identification aux 1037 isolats récoltés au cours de nos analyses microbiologiques. Nous avons ainsi pu reconnaître 16 espèces appartenant toutes soit à la famille des Endomycetaceae, soit à celle des Cryptococcaceae.

Nous avons résumé les résultats de nos analyses dans le tableau 2.

a) Endomycetaceae

- Saccharomyces acidifaciens (Nickerson) Lodder et K.van Rij : cette espèce fermentant uniquement le glucose , se retrouve surtout dans les viandes de porc et de boeuf, ainsi que dans le pâté de foie et le saucisson pur porc.
- Saccharomyces sp proche de S. rouxii mais qui n'assimile pas le maltose, a été isolé à partir des saucisses à cuire et des knacks.
- Hansenula subpelliculosa Bedford faisait partie de la flore du pâté de foie.

Tableau I : Résultats des analyses microbiologiques. Nombre de germes /g de produit. Les chiffres entre parenthèses correspondent au dénombrement des E.coli . +: présence.

Substrats	Levures	Aérobies mésophiles	Psychro- trophes	Coliformes et <u>E. coli</u>	Streptoco- ques fécaux	Staphylo- coques patho- gènes	Clostridia patho- gènes	Salmonelles
Viande de porc	20	3×10^7	2×10^3	1×10^5 (5)	0	1000	0	0
Viande de boeuf	270	$1,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$ (60)	0	0	0	0
Viande de porc	0	$6,8 \times 10^5$	780	15	0	0 0	0	0
Knacks	250	4×10^6	9×10^3	20	3×10^3	0	0	0
Knacks	0	4×10^3	225	6	0	0	0	+
Knacks	0	8×10^3	25	2,5	0	0	0	0
Knacks	0	3×10^4	927	800	0	0	0	0
Rôti de dinde	0	$1,3 \times 10^4$	210	80	500	0	0	0
Rôti de dinde	50	2×10^7	2×10^5	7×10^4	500	0	0	0
Rôti de dinde	0	1×10^5	2×10^4	25	500	0	0	0
Saucisse à cuire	2×10^3	$1,2 \times 10^8$	3×10^5	1×10^4	0	50	0	+
Saucisse à cuire	$2,4 \times 10^3$	1×10^8	2×10^5	7×10^4 (6)	0	0	0	0
Saucisse à cuire	$1,8 \times 10^3$	$2,3 \times 10^8$	$1,7 \times 10^4$	130	0	70	0	0
Saucisse à cuire	$3,6 \times 10^3$	8×10^7	8×10^3	600	5×10^4	720	0	0
Saucisse à cuire	0	3×10^2	0	0	6	0	0	0
Saucisse de viande	0	6×10^3	0	0	0	0	0	0
Saucisse de viande	0	500	0	0	0	0	0	0
Saucisse de viande	0	900	270	0	25	0	0	0
Saucisson pur porc	$3,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^8$	2×10^4	2×10^4 (250)	0	0	0	0
Saucisson pur porc	7×10^3	7×10^7	$1,2 \times 10^3$	9×10^4 (250)	0	0	0	0
Saucisson pur porc	20	4×10^7	480	7×10^4 (50)	0	+	0	0

Tableau I (suite)

Substrats	levures	Aérobies mésophiles	Psychro- trophes	Coliformes et E. coli	Streptoco- ques fécaux	Staphyloco- ques patho- gènes	Clostridia sulfuro- réducteurs	Salmonelles
Saucisson pur porc	160	$2,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^3$	9×10^4 (60)	0	+	100	0
Saucisse vien- noise	130	4×10^6	$1,4 \times 10^4$	0	2×10^3	0	0	0
Saucisse à rôtir	20	$1,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^4$	0	0	2500	0	0
Saucisse à rôtir	40	$1,1 \times 10^8$	7×10^2	$3,3 \times 10^3$ (30)	2×10^4	+	0	0
Saucisse à rôtir	0	$1,2 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0
Saucisse à rôtir	0	900	270	0	25	0	0	0
Cervelas	0	$2,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	0	0	0	0
Cervelas	0	6×10^4	850	0	0	0	0	0
Tripes	70	3×10^8	2×10^4	6	0	0	0	0
Tripes	30	$3,4 \times 10^8$	3×10^5	0	0	0	0	0
Pâté de foie	650	3×10^7	$2,9 \times 10^3$	0	2×10^3	0	0	0
Pâté de foie	0	$1,2 \times 10^5$	950	6	0	0	0	0
Pâté de foie	0	$3,8 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0
Boudin noir	0	$1,6 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0
Boudin noir	0	700	500	0	6	0	0	0
Terrine de viande	$3,4 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	0	+	0	0	0
Rillettes de dinde	$1,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^8$	$1,3 \times 10^5$	7×10^4	7×10^3	+	0	+
Fromage de tête	4×10^5	$1,6 \times 10^8$	5×10^7	0	2×10^7	0	0	0
Déchets de carnasse	$2,6 \times 10^3$	2×10^7	$1,8 \times 10^6$	5×10^4	7×10^4	+	0	+

- Debaryomyces kloeckeri Guilliermond et Péju s'est développé dans la terrine de viande où elle représentait la seule espèce , ainsi que dans les déchets de carcasse. Cette espèce a également été dénombrée parmi les levures des saucisses de Francfort par DRAKE et al (1958).
- Debaryomyces subglobosus (Zack.) Lodder et K. van Rij . Ce sont les rillettes de dinde et le pâté de foie qui en contenaient le plus. Cette espèce a aussi été isolée à partir des produits carnés par DRAKE et al (1958).

Les espèces appartenant au genre Debaryomyces sont fréquemment retrouvées dans les saumures de viande. Elles présentent une grande tolérance vis à vis du sel et des acides organiques. Ces propriétés, ainsi que leur croissance aux basses températures expliquent leur présence dans ces produits alimentaires.

b) Cryptococcaceae .

- Torulopsis sp a été retrouvé dans les saucisses à cuire, de même que T. candida (Saito) Lodder. Cette dernière espèce a aussi été observée par DRAKE et al (1958) dans les saucisses et par WALKER et AYRES (1959) dans les viandes de volaille. Torulopsis aerea (Saito) Lodder a été rencontrée dans le pâté de foie. Enfin Torulopsis versatilis (Etchells et Bell) Lodder et K. van Rij a été isolé à partir des saucissons pur porc.
- Candida melinii Diddens et Lodder se développe dans de nombreux produits analysés, en particulier dans la terrine de viande, les saucisses viennoises, le pâté de foie.

Candida zeylanoides (Cast.) Langeron et Guerra a uniquement été mis en évidence dans le pâté de foie, alors que Candida lipolytica (Harrison) Diddens et Lodder n'a été vu que dans la viande de boeuf. C'est dans le saucisson pur porc que s'est développé Candida rugosa (Anderson) Diddens et Lodder.

- Trichosporon pullulans (Lindner) Diddens et Lodder a été isolé à partir de saucisse à cuire et du pâté de foie.
- Rhodotorula mucilaginosa (Jörg.) Harrison a été trouvé dans la viande de boeuf ainsi que dans la saucisse à cuire, le saucisson pur porc alors que Rhodotorula glutinis (Fres.) Harrison n'était que dans la saucisse à cuire.

III. OBSERVATION DE LA SURFACE DE QUELQUES DENREES ALIMENTAIRES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.

Afin de compléter l'étude précédente, nous avons observé au microscope électronique à balayage quelques denrées alimentaires, en essayant de mettre en évidence différents microorganismes et en particulier les levures.

Ainsi, sur la viande de boeuf (photographie 1) nous n'avons pas observé de microorganismes à des grossissements relativement faibles. Par contre à 6000 on rencontre de très nombreuses bactéries dans les replis des fibres musculaires (photographie 2). Ces germes pénètrent lentement entre les fibres (photographie 3) ou émettent des substances mucilagineuses très abondantes qui les englobent presque totalement (photographies 3 et 5). Il n'est plus possible alors de distinguer avec netteté les contours des microorganismes. La photographie 4 montre cette disparition progressive de la bactérie, soit à la suite d'émission de mucilage, soit par production d'enzyme protéolytique.

Différentes hypothèses peuvent être retenues pour expliquer l'absence de levures sur cette denrée alimentaire. Mais il semble que les plus plausibles soient le nombre restreint de germes sur la viande de boeuf ou les faibles surfaces exploitables en microscopie électronique à balayage.

La saucisse à cuire par contre nous a permis d'observer de très nombreux champignons, en particulier sur les faces internes des boyaux.

Lorsque le boyau est constitué par une substance semi-naturelle, on peut voir, après 48 heures de conservation du produit à température ambiante, de nombreuses jeunes colonies de Penicillium (photographies II et I2) . Nous n'avons par contre jamais rencontré de mycélium sur la face interne de l'emballage. Cette face externe porte aussi des bactéries (photographie 7), ici probablement des Streptocoques, ainsi que des organismes dont la nature exacte est indéfinissable car ils sont partiellement inclus et enrobés de mucilage (photographies 9 et I0). Enfin, c'est sur la face interne que l'on peut observer un développement important de levures. On y rencontre fréquemment des colonies comparables à celle de la photographie 8.

Dans le cas des boyaux naturels, le développement de la microflore, dans les mêmes conditions (48 heures à la température ambiante) est encore plus important. La face externe montre de très nombreuses colonies de champignons (photographies I6,I7,I8). Cependant à ce stade les colonies sont encore petites et éloignées les unes des autres. Par contre sur la face interne les levures se développent en quantités impressionnantes (photographie I5). Il arrive aussi que de petites colonies de ces germes croissent au milieu de quantités très élevées de bactéries (photographie I3) Des colonies de procaryotes comparables à celle de la photographie I4 ne sont pas rares.

Nous devons enfin signaler que nous n'avons jamais ou exceptionnellement vu de microorganismes sur du boyau artificiel (plastique).

Il semble donc, à la lumière de ces investigations, que les levures se développent de façon préférentielle sur la face interne des enveloppes entourant les produits carnés. Leur multiplication peut être très rapide et très importante si l'on n'observe pas des règles élémentaires d'hygiène et de conservation et cela sans que le consommateur s'en aperçoive au moment de l'achat.

CONCLUSIONS

Qualitativement et quantitativement, ce sont les saucisses à cuire, les saucissons pur porc et surtout le pâté de foie qui sont les plus riches en levures. Dans les autres denrées, le nombre des espèces est réduit et souvent on ne rencontre qu'une seule espèce.

Les champignons les plus couramment rencontrés sont Rhodotorula mucilaginosa et Candida melinii.

Les résultats obtenus confirment les données bibliographiques. Les principaux genres trouvés, Saccharomyces, Debaryomyces, Hansenula, Torulopsis, Candida, Trichosporon et Rhodotorula sont fréquemment rencontrés sur les produits carnés.

Le rôle des levures est souvent minimisé dans ces produits. Ces germes peuvent cependant intervenir directement ou indirectement dans l'altération des denrées alimentaires. Cette action est fonction de nombreux facteurs, dont les principaux sont :

- leur vitesse de pénétration dans les produits carnés, facteur lié à leur taille et à leur équipement enzymatique.
- la quantité et la vitesse de diffusion de ces enzymes .
- les possibilités lipolytiques et protéolytiques de ces germes .
- leur aptitude enfin, à favoriser ou inhiber le développement des autres saprophytes et de certains pathogènes.

Ces germes peuvent devenir très importants lorsque la denrée alimentaire a été traitée aux radiations ou aux antibiotiques. D'autre part il est connu que les levures peuvent se développer dans des produits contenant un pourcentage d'eau inférieur à celui des milieux dans lesquels peuvent croître les bactéries. Ces facteurs physiques ou chimiques aboutissent parfois à ce que ces microorganismes soient les principaux responsables des altérations constatées.

DEMPSTER (1972) a pu constater qu'une levure halotolérante (Torulopsis sp) réduit les nitrates. Son activité lipolytique dépend de la nature des graisses, du pH, de la concentration en sel et de la présence d'oxygène. Les levures glucidotolérantes en accumulant à l'intérieur de leur cellule des polyols, stabilisent ainsi certaines activités enzymatiques lors de la diminution de l'a.w. (activité de l'eau). DRAKE et al (1959) signalent aussi qu'un nombre important de levures et de moisissures résistent très bien au fumage des aliments, sans que l'on puisse expliquer cette résistance. Enfin DEVOYOD et DESMAZEAUD (1971) ont pu constater que Saccharomyces fragilis, S. lactis et Torulopsis sphaerica stimulent la croissance des lactobacilles.

Au cours des prochaines expériences, nous allons tenter de vérifier les hypothèses que nous avons émises, en particulier le pouvoir de pénétration des levures dans la viande, leur activité enzymatique et leur influence sur les autres microorganismes présents.

Photographie 1 : Coupe dans un muscle strié de boeuf montrant les paquets de fibres et les espaces vides correspondant initialement à l'emplacement du tissu conjonctif.

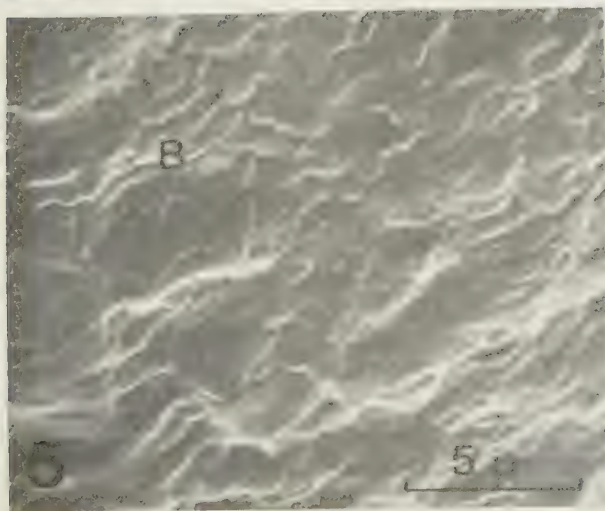
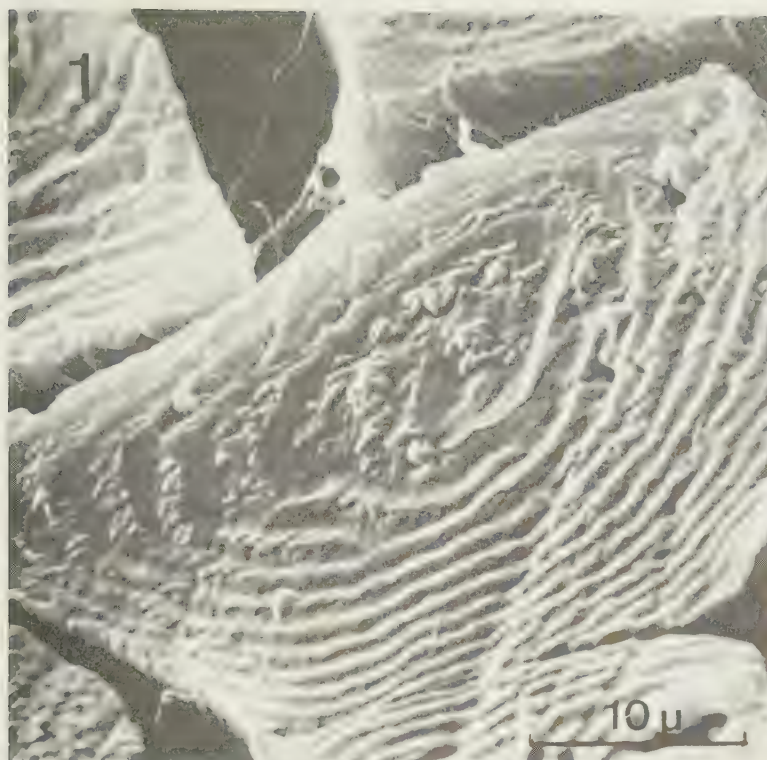
Photographie 2 : Grossissement de la photographie précédente montrant les bactéries se développant dans les replis.

Photographie 3 : Bactéries entre les fibres musculaires (B) et bactéries incluses dans le mucilage (BI)

Photographie 4 : Bactérie à la surface de la viande.

Photographie 5 : Bactérie (B) dans le mucilage.

Photographie 6 : Champignon sur la face externe d'une saucisse à cuire.

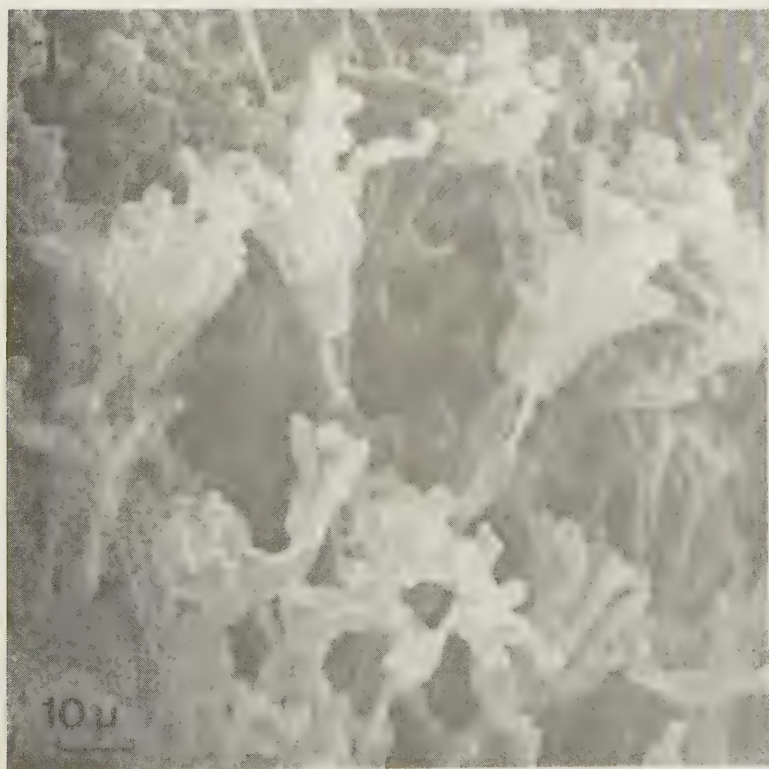
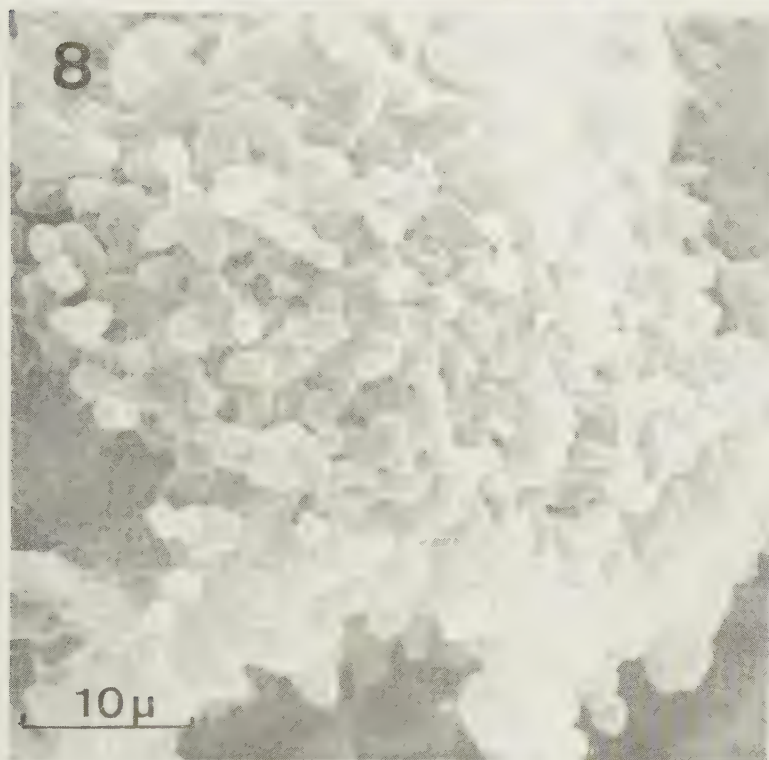


Photographie 7 : Bactéries à la surface d'une saucisse à cuire (boyau semi- naturel).

Photographie 8 : Colonie de levures à l'intérieur d'une enveloppe semi-naturelle de saucisse à cuire.

Photographies 9 et 10 : Microorganismes plus ou moins inclus dans du mucilage.

Photographies 11 et 12 : Colonie de Penicillium à la surface d'un boyau semi-naturel de saucisse à cuire.

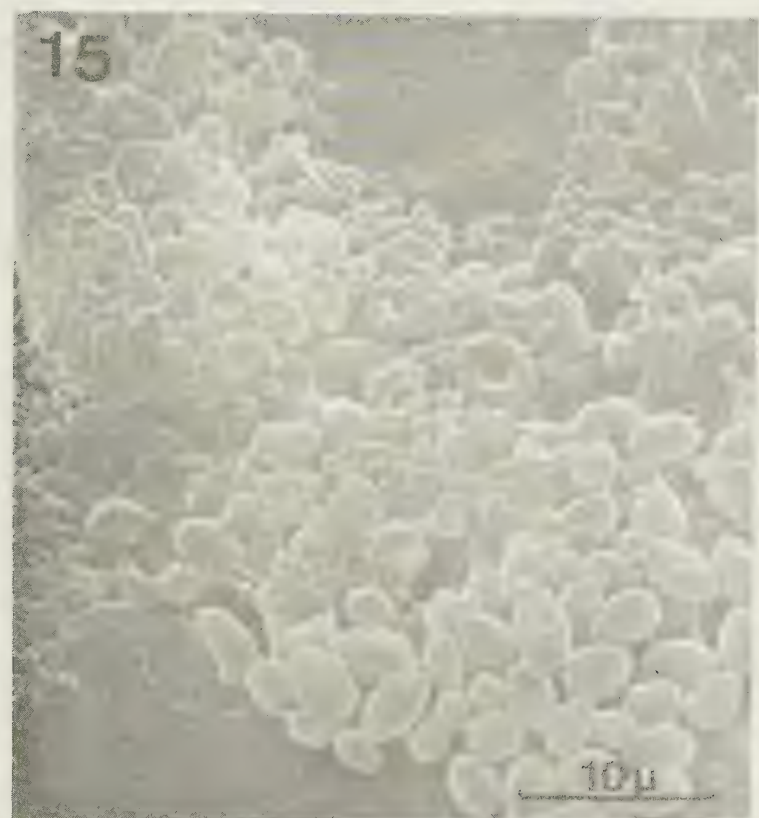
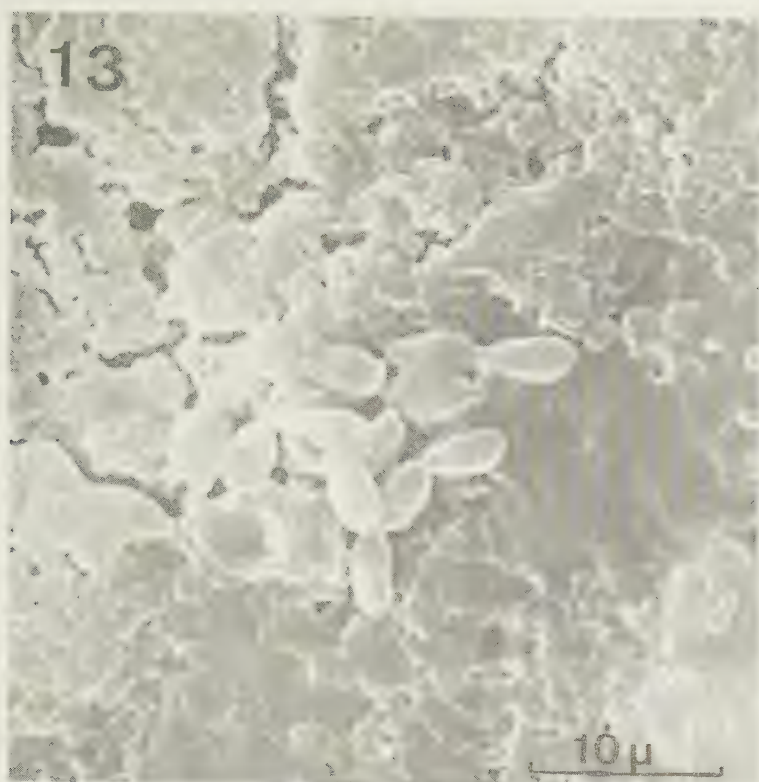


Photographie I3 : Colonie de levures face interne de boyau naturel, entourée par des bactéries.

Photographie I4 : Boyau naturel ,face interne: colonie de bactéries.

Photographie I5 : Colonie de levures sur la face interne de boyau naturel.

Photographies I6 - I7 - I8 : Champignons à la surface de boyau naturel.



CHAPITRE II

PENETRATION DES LEVURES DANS LA VIANDE

Etant donné la fréquence d'apparition des levures dans les produits alimentaires à base de viande, nous allons essayer de vérifier les possibilités de pénétration de ces champignons dans ces substances et plus spécialement dans les muscles.

La littérature concernant les mécanismes et les vitesses de pénétration dans ce type de produit n'est que peu fournie. Après la mort de l'animal, les protections naturelles disparaissent et les microorganismes saprophytes peuvent théoriquement envahir les tissus. La présence de graisses ou de tissus de connection à la surface des quartiers empêchent ou freinent l'entrée des germes de surface dans les muscles. Ce n'est qu'après fragmentation, réchauffements et manipulations que la microflore (essentiellement des aérobies) augmente et se diversifie. Les souches les plus fréquentes et les plus dangereuses appartiennent surtout aux genres Pseudomonas, Achromobacter, Micrococcus et Clostridium. Les moisissures sont représentées par des Penicillium, Aspergillus, Rhizopus, Mucor, etc.... Enfin les levures (voir chapitre I) peuvent entre autre, grâce à leur pouvoir lipolytique, provoquer le rancissement de la viande.

Selon TEST (1958), la pénétration des microorganismes est lente et bien souvent les germes ne sont pas rencontrés à plus de 1-2cm de profondeur, même si la viande dégage une odeur putride.

L'envahissement d'un important quartier se fait essentiellement par l'intermédiaire du sang, de la lymphe etc... mais non à travers le muscle lui même (TERCHEV^{et al} 1957, FRAZIER 1958) et il dépend d'un nombre important de facteurs physiques et chimiques : humidité, température, structure histologique.... (ALGULNIK et KORNEJEV 1959).

MALAKOV (1965) a signalé que des bactéries pouvaient pénétrer jusqu'à 5cm de profondeur dans un morceau de viande de 2kg, après 24 heures à la température ambiante, alors que l'ensemble

était envahi après le même temps à 37°C. Mais à 2-4°C, la microflore est pratiquement absente sous 1cm, après 30 jours.

ELMOSSALAMI et WASSEF (1971) ont étudié l'entrée de quelques microorganismes dans la viande fraîche, congelée ou cuite. C'est ainsi que différents germes, entre autre des Salmonella, Proteus, Pseudomonas et Streptococcus seraient présents à 10-15cm de profondeur selon la température et la durée d'incubation. Ces mêmes auteurs ont suivi le développement d'une levure : Saccharomyces zimmeri. Après 25 heures à 30°C, ce champignon a pu être isolé à -3cm. On l'a retrouvé à la même profondeur après 36 heures à 7°C et à -1cm après 60 heures à -10°C. Si à 37°C et à 7°C il prolifère à la surface de la denrée alimentaire, selon les auteurs précédemment cités il ne pénètre pas à plus de 3cm dans la viande.

Au cours de cette expérience, nous allons tenter de vérifier les possibilités et éventuellement les vitesses de pénétration de deux levures : Rhodotorula mucilaginosa et Candida melinii particulièrement fréquentes au cours des analyses précédentes. Pour vérifier ces propriétés nous avons utilisés trois techniques différentes :

- Le dépôt direct des levures sur des blocs de viande et la vérification après des temps variables de la présence de germes sur le milieu de culture sous-jacent.
- L'utilisation de produits marqués permettant la mise en évidence de substances libérées par ces champignons dans le produit alimentaire.
- L'observation de viande au microscope électronique.

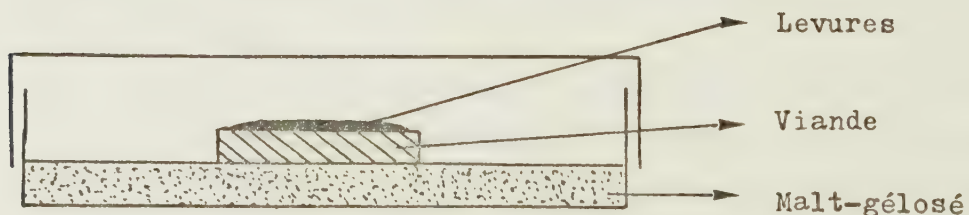
I. DEPOT DES LEVURES SUR LES BLOCS DE VIANDE

MATERIEL ET METHODES

Les deux levures choisies (R. mucilaginosa et C. melinii) sont conservées sur milieu " Morphologic Agar".

Au moment de l'expérience elles sont repiquées séparément sur des disques de viande de boeuf de 4cm de diamètre et de 1cm d'épaisseur. Ces derniers reposent sur un milieu à l'extrait de malt gélosé contenu dans les boites de Pétri (Figure 2). L'ensemble est incubé à température ambiante. Toutes les heures durant les dix premières heures, puis après 24, 27 et 48 heures les fragments de viande sont transplantés sur des milieux neufs. Les boites ayant contenu les blocs de viande sont placées à l'étuve à 22°C et examinées après une semaine afin de vérifier la présence éventuelle de levures.

Figure 2 : Dispositif expérimental pour l'étude de la pénétration des levures dans la viande.



Les blocs de viande sont obtenus de la manière suivante : après avoir coupé des tranches de viandes de 1cm d'épaisseur à l'aide

d'instruments stériles, on taille à l'emporte pièce passé à la flamme au préalable, des cylindres de 4cm de diamètre. Ces opérations sont effectuées sous une hotte à ultraviolets.

Pour chaque levure, cinq répétitions furent réalisées. De plus cinq blocs de viande, traités de la même manière, mais non ensemencés, servent chaque fois de témoins.

RESULTATS

Les résultats sont consignés dans le tableau 3. De nombreuses colonies de bactéries se développent à l'emplacement et surtout à la périphérie du bloc de viande, après toutes les analyses.

Tableau 3 : Etude de la pénétration des levures dans les muscles de boeuf.

Temps en heures	Témoins	Rhodotorula	Candida
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	+
24	0	0	0
27	0	0	0
48	0	0	0

Sur les milieux de culture les levures n'ont été décelées que dans un seul cas : on a pu observer quelques colonies de C.melinii

avec un seul bloc, après 10 heures d'incubation. Mais ce résultat doit être interprété avec beaucoup de prudence étant donné qu'il ne s'agit que d'un *Seul bloc*.

2. UTILISATION DU ^{14}C

Bien que ne pénétrant pas, ou très peu dans la viande, la prolifération des levures à la surface de cette denrée alimentaire comme l'ont prouvé diverses observations que nous avons faites, doit influencer sur la qualité organoleptique de ce produit, ainsi que sur les différents microorganismes qu'il contient, par l'émission de diverses substances.

Nous avons tenté de démontrer la production de telles substances et leur diffusion, en faisant consommer du glucose marqué à Rhodotorula mucilaginosa et Candida melinii, puis en plaçant ces derniers sur des fragments de viande. On évalue la pénétration des enzymes ^{et d'autres substances} par l'apparition d'une radio-activité sous les blocs de muscle de boeuf.

MATERIEL ET METHODES

a) Préparation des levures

Les deux levures isolées à partir de produits carnés ont étéensemencées sur le milieu suivant :

- Extrait de levure.....	0,45%	}	4ml	}	pH 7
- Bacto peptone.....	0,75%				
- glucose.....	9%		2ml		

La température d'incubation était de 25°C. Ces microorganismes ont été repiqués quatre fois de suite sur le même milieu.

Avant de placer les germes sur le milieu contenant les éléments marqués, nous les avons ensemencés dans un milieu liquide identique au précédent mais ne contenant que 6% de glucose et nous avons réalisé une culture agitée. Cette expérience nous a permis de tracer une courbe de croissance de R.mucilaginosa et de C. melinii (Figure 3) à l'aide d'un néphélomètre Thorp. Pour les manipulations qui suivent, nous avons toujours prélevé les levures en phase exponentielle de croissance de façon à pouvoir répéter nos expériences.

b) Culture sur éléments marqués.

Lorsque les levures sont en phase exponentielle de croissance nous avons prélevé 5ml de la culture que nous avons centrifugés, puis dont nous avons éliminé le surnageant. On lave ensuite l'ensemble dans le milieu de culture précédent sans glucose. On essaye d'éliminer ainsi la totalité des hydrates de carbone subsistant dans le culot. Puis on ajoute 4ml de ce milieu et 1ml d'eau stérile contenant 50µC de glucose marqué.

Les cultures sont laissées dans ce milieu durant 8 heures et agitées périodiquement. Durant cette période nous avons vérifié la quantité de glucose marqué absorbé en centrifugeant un tube et en prélevant 10µl du surnageant qui sont mélangés avec 10µl de solvant (Insta-gel) (Tableau 4).

Nous pouvons constater , en tenant compte de la diminution du nombre de coups par minutes dans le surnageant que la quantité de ^{14}C absorbé par les levures reste relativement faible, et même négligeable en ce qui concerne R. mucilaginosa .

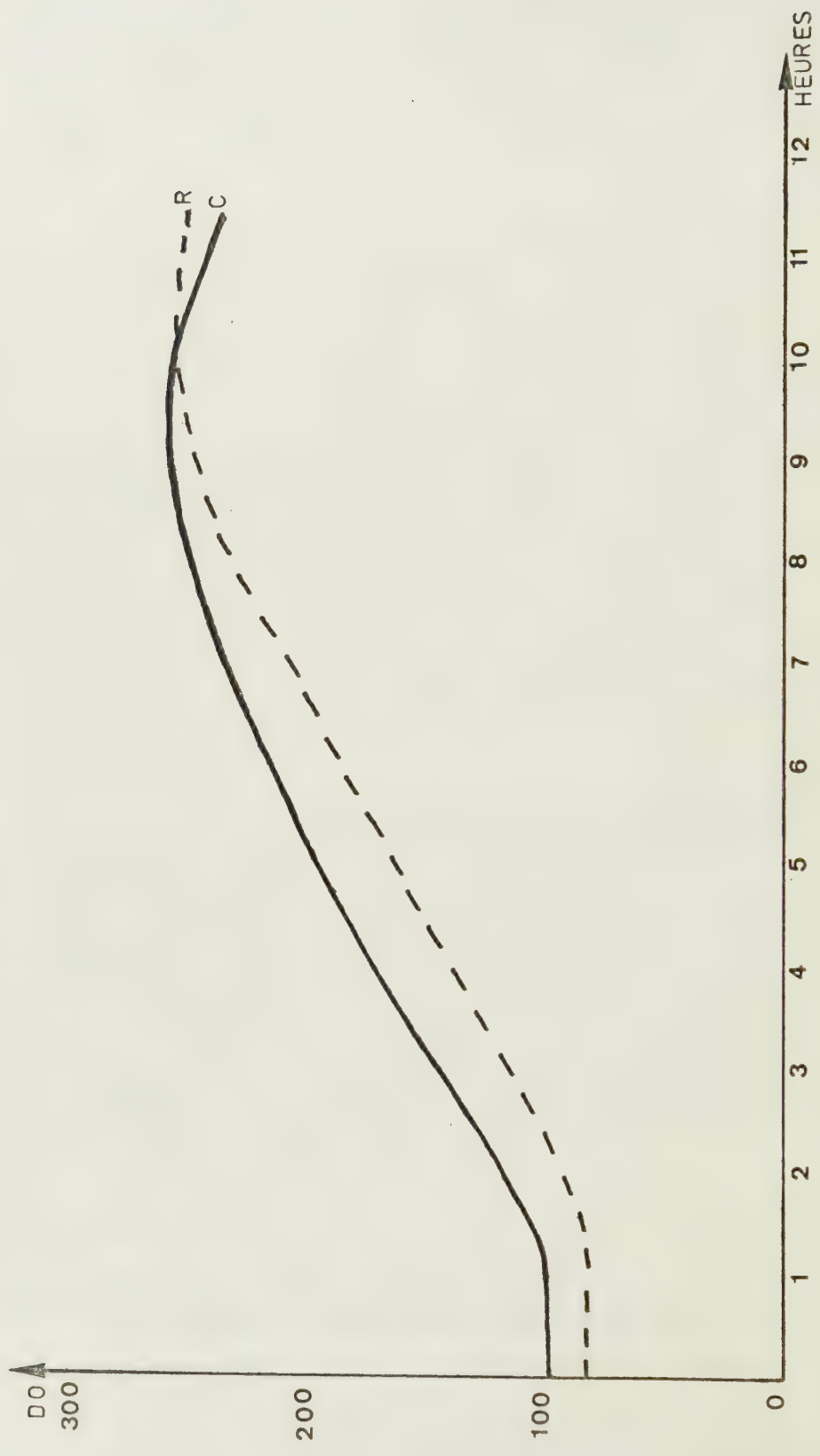


Figure 3 : Courbe de croissance de R. mucilaginosa (R) et de C. melinii (C)

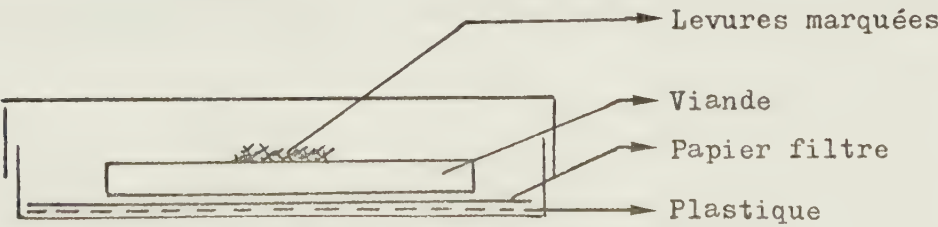
Tableau 4 : Absorption du glucose marqué.Au temps To on ajoute x ml de glucose marqué dans le milieu de culture. Aux temps indiqués on prélève 10µl surlesquels s'effectuent la détermination de radioactivité. Les résultats sont exprimés en CPM.

<u>Rhodotorula</u> <u>mucilaginosa</u>	heures	0,30	1,30	2,30	3,30	4,20	5,50	8,0
		9000I3	9000I3	9000I2	900000	897842	896843	88559I
<u>Candida</u> <u>melinii</u>	heures	0,30	1,30	2,30	3,30	4,20	5,50	8,0
		9000I4	9000I0	829873	706054	569I70	499827	446300

C.P.M. : coups par minute.

Après 8 heures les cultures sont centrifugées et le culot est lavé deux fois avec le milieu non glucosé. Puis on dépose 10 µl de la suspension obtenue sur un disque de viande de boeuf dont l'épaisseur varie de 2 à 16mm suivant les échantillons.Le tout est disposé sur un papier filtre doublé d'une feuille de plastique (Figure 4).

Figure 4 : dispositif expérimental



La viande a été préférée aux autres produits carnés du fait de sa relative homogénéité physique et chimique.

Après 34 heures à la température ambiante on a prélevé le disque de papier que l'on place dans 10ml de solvant Insta-gel. Les mesures de radio-activité sont faites à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

RESULTATS

Ils sont consignés dans le tableau 5. Contrairement à ceux du tableau 4, ils laissent entrevoir une activité plus importante de R. mucilaginosa . Cette expérience n'a cependant à nos yeux qu'une valeur qualitative. Il est possible que dans l'inoculum initial (IOpl) le nombre de levures ne soit pas identique dans les deux cas.

Une autre observation importante, c'est que l'action des levures se fait apparemment de façon graduelle. Cela prouve que la pénétration des levures ou la diffusion des substances relachées se fait bien ici à travers les tissus musculaires et non par l'intermédiaire des canaux sanguins par exemple, car dans ce dernier cas, le passage serait rapide pour tous les blocs de viande étudiés.

Tableau 5 : Radio-activité mesurée dans le papier filtre après 36 heures (moyenne de 5 mesures).

Epaisseur des cylindres de viande en mm	C.P.M.	
	<u>R. muoilaginos</u> a	<u>C. melinii</u>
2	2574	963
4	2204	776
6	1859	538
8	1511	405
10	1060	394
12	570	320
14	542	256
16	513	243

Il n'est cependant pas possible de prouver à l'aide de cette seule expérience que la radio activité observée a pour

origine les levures ou les enzymes. Mais la technique est très sensible et elle permet de détecter des quantités très faibles de substances ou de germes. Cela est d'autant plus important que le morceau de viande n'est pas stérile au départ. Il est donc possible d'observer une action éventuelle de la levure au sein d'une association de microorganismes normalement présents sur et dans cette denrée alimentaire.

D'autre part, s'il n'y a pas pénétration, ce que prouvera l'expérience suivante, on peut néanmoins dissocier les enzymes d'origine fongique et celles des autres germes présents et de ce fait prouver que la levure peut avoir une action à distance par l'intermédiaire de ces substances. La technique est d'autant plus intéressante qu'elle permettra de déceler des quantités plus faibles.

En conclusion de cette expérience, on peut affirmer que soit la levure, soit des produits issus de son métabolisme traversent les fibres musculaires et peuvent éventuellement influencer sur la microflore présente ainsi que modifier la qualité organoleptique de la viande.

3. OBSERVATIONS A L'AIDE DES MICROSCOPES ELECTRONIQUES

Le dépôt direct des levures sur les fragments de viande n'a pas permis d'observer une pénétration similaire à celle décrite par d'autres auteurs. L'utilisation des éléments marqués nous a cependant révélé une radio-activité sous la denrée alimentaire après 36 heures d'incubation. Cela laisse supposer que la levure ou les substances qu'elle libère ont traversé les fibres musculaires. C'est ce problème que nous essayons de résoudre en utilisant la microscopie électronique à balayage et à transmission.

MATERIEL ET METHODES

Pour le MEB, nous avons observé directement les échantillons après déshydratation et métallisation.

Pour le MET, nous avons prélevé des fragments directement sous les levures puis les morceaux de muscles ont été traités de la manière suivante :

- Fixation au glutaraldéhyde : 1 heure
- Rinçage 3 fois de suite dans le tampon Soerensen.
- On laisse 3 heures au réfrigérateur.
- Remplacer alors par l'acide osmique à 1% durant 1 heure.
- Déshydrater et inclure dans l'épon.

Les coupes fines ont été réalisées au couteau de diamant.

MEB : microscope électronique à balayage

MET : microscope électronique à transmission.

RESULTATS

a) Témoins

Sur les photographies de 19 à 28 il est possible de reconnaître et de situer les principaux composants du muscle. On peut observer les paquets de fibres musculaires (photographies 19, 20 et 21) séparés par l'endomysium , alors que le périnysium séparant les faisceaux primaires et l'aponeurose sont réduits (par suite de la dessiccation au cours de la préparation des échantillons pour le M.E.B.) à des fibrilles reliant les faisceaux primaires de fibres (photographies 21 et 24).

Sur ces échantillons conservés plus de deux mois en chambre froide après la mort de l'animal, on peut encore observer les

différents éléments constituant la myofibrille (photographie 25 et figure 5). Les myofilaments constituant les bandes A et I sont encore bien visibles. La bande H, ainsi que les stries M et Z sont encore nettement distinctes (photographie 25).

Entre les sarcomères constituant les myofibrilles il est encore possible de reconnaître des noyaux avec leur nucléole et leur chromatine (photographie 26) ainsi que des coupes transversales d'axones myélinisés (photographie 28). Les mitochondries restent aussi très nombreuses et elles sont encore présentes même après une attaque bactérienne importante (photographies 38 et 42). Entre les paquets de fibres, le tissu conjonctif apparaît plus ou moins granuleux à des faibles grossissements (photographie 27).

b) Modifications ultrastructurales des fibrilles.

- Au niveau de la bande A

Sur les figures témoins obtenues au début de l'expérience (photographies 25 et 29) les sarcomères présentent une bande H et une strie Z bien nette. D'autre part les myofilaments, en particulier ceux de la bande I restent parallèles.

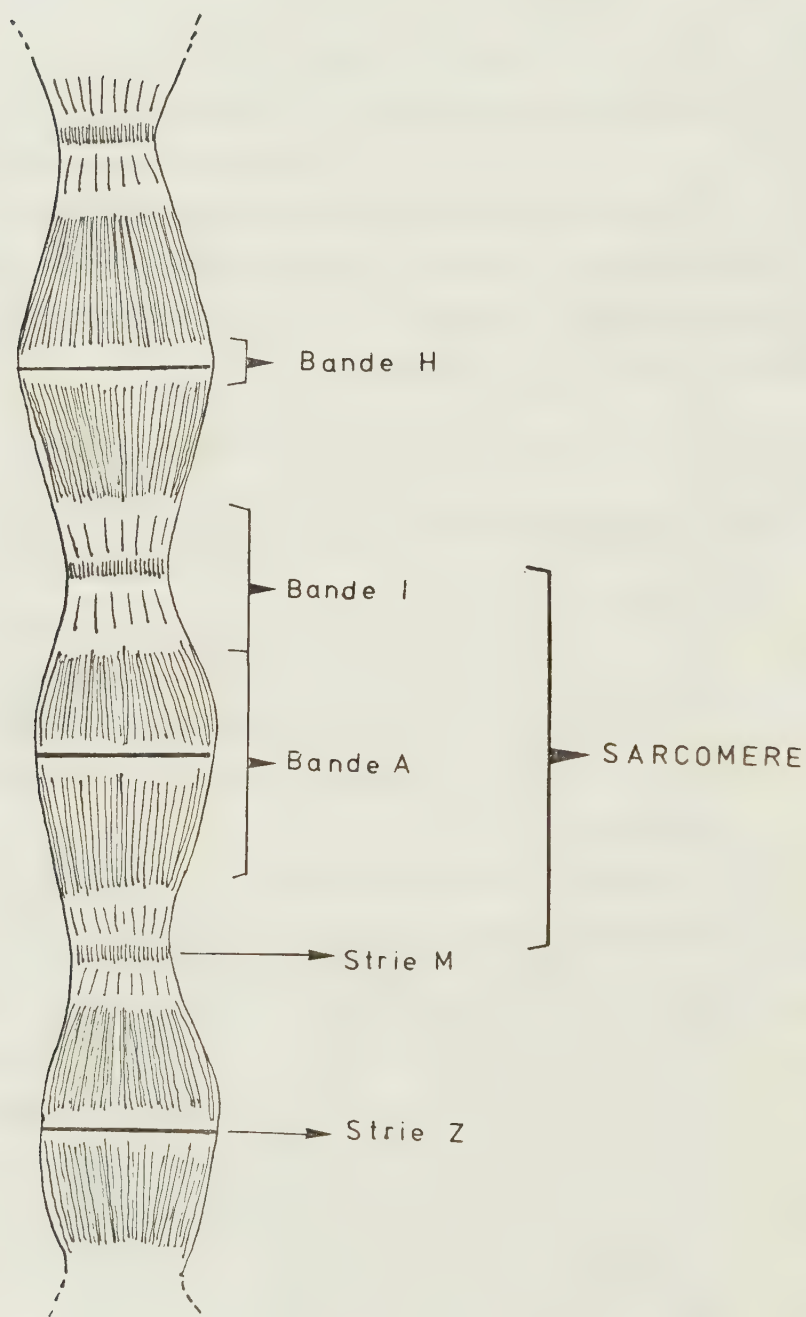
Après 48 heures de contact on peut observer certaines différences dans l'ultrastructure. Ces modifications restent cependant localisées lorsque l'on s'adresse aux parties internes. La bande A devient moins dense (photographies 31 et 32) et l'on peut observer une disparition progressive de la bande H (photographie 30) Cette bande , encore visible par endroit, s'atténue (photographie 31) et disparaît parfois totalement (photographie 32) alors que les fibrilles présentent le même aspect qu'avant de part et d'autre de l'emplacement initial de cette bande.

- Au niveau de la bande I

Par rapport au témoin (photographie 25) on peut constater que les fibrilles de la bande I ont une tendance

Figure 5 : Schéma d'une myofibrille.

La succession des sarcomères forme la myofibrille. Chaque myofibrille est constituée par des myofilaments disposés parallèlement.



à perdre leur disposition parallèle et à se rompre avant que la ligne Z disparaisse (photographie 33). Cette désagrégation continue et s'amplifie par la suite (photographie 34). Les fibrilles disparaissent même parfois totalement entre Z et la bande A (photographie 35). Dans ce cas la ligne Z elle même est détruite. La photographie 35 montre que cette lyse n'est pas générale et simultanée. Des myofibrilles voisines peuvent présenter des stades de dégradation différents.

Il faut encore remarquer que la disparition des fibrilles de la bande I coïncide avec celle de la ligne H.

- Tentative d'interprétation.

Les sarcomères sont constitués par de la myosine et de l'actine. La bande I est formée de G-actine (Globular actin) enroulée en spirale autour d'un filament de type tropomyosine (HUXLEY 1965). L'ensemble est désigné sous le terme de F-actine (Filament actin).

Selon BENDALL (1969) la G-actine s'arrêterait de part et d'autre de la ligne Z. Cette dernière serait en fait constituée par une plaque de molécule du type tropomyosine.

La bande A serait formée de myosine entre lesquelles se disposeraient ^{en} les filaments de F-actine. Les G-actines s'interrompraient à nouveau au niveau de la ligne M. On peut supposer que la clarification de la bande A au cours de la dégradation résulte d'une digestion partielle ou totale de l'actine et en particulier de la G-actine. Cette hypothèse expliquerait la disparition des bandes H et l'apparition progressive de taches plus claires dans les sarcomères (photographie 30).

Cette explication semble d'autant plus acceptable que l'on assiste simultanément à un éclaircissement de la bande A et à une digestion enzymatique de la bande I.

Cependant compte tenu de la bibliographie, il faut conclure avec beaucoup de prudence. Selon de nombreux auteurs (ABERLE et MERKEL 1966, LAWVRIE et al 1963, SCOPES 1964, Mc INTOSH 1967, DAVEY et GILBERT 1968 a , 1968b et 1969, HENDERSON et al 1970, CHAUDHRY et al 1969, FUJIMAKI et al 1965, etc...) on peut constater éventuellement une modification des protéines myofibrillaires au cours de la conservation postmortem . Il est possible d'observer une disparition plus ou moins prononcée des stries Z et M. L'activité actomyosine ATPase croît aussi sans que l'on puisse établir de relations entre cette augmentation et les modification ultrastructurales.

c) Activité des microorganismes.

Les levures ne pénètrent pas dans les tissus musculaires. Cela confirme les deux expériences précédentes : levures marquées et dépôt direct des levures sur la viande. Cependant on retrouve ces germes à la surface de la viande (photographies 22 et 23) plus ou moins englobés dans du mucilage et dans des substances dégradées.

Bien que n'entrant pas dans les fibres musculaires, leur présence se traduit par une altération plus prononcée des tissus par rapport au témoin , ainsi que par un nombre plus élevé de bactéries. Il est possible que, tout en accélérant le processus de dégradation, l'activité enzymatique des levures et la diffusion de leurs enzymes dans les muscles permettent un développement plus important des procaryotes ne serait ce qu'en dilacérant, en séparant les myofibrilles, donc en augmentant la surface de contact entre les microorganismes et le substrat.

La pénétration des bactéries dans la viande de boeuf et la dégradation de cette dernière se font apparemment suivant certaines étapes :

- La préparation des échantillons pour le MEB montre qu'il existe déjà certains points faibles (photographies 19,

21 et 24). Il s'agit du conjonctif qui relie les paquets de fibrilles.

La microscopie électronique à transmission confirme d'ailleurs cette hypothèse (photographie 36). C'est entre les paquets de fibrilles, dans le conjonctif que l'on retrouve des quantités très élevées de microorganismes. Les figures de division que l'on peut apercevoir prouvent que ces bactéries sont très actives.

L'aspect granuleux du conjonctif témoin (photographie 26) a disparu (photographies 34, 38, 42,43 et 44). Ce tissu peut encore subsister par plaques (photographies 43 et 44)

- Une fois ces paquets de fibres séparés , sous l'action ou non de la microflore, la surface de contact est considérablement augmentée et les bactéries s'attaquent directement aux myofibrilles (photographies 37,38,41,42 et 45). On peut parfois observer une séparation des paquets de fibres (photographies 37 et 38). Ces dernières perdent souvent leur disposition parallèle (photographie 41). Dans quelques cas elles sont même plus ou moins isolées (photographie 42). On peut aussi fréquemment constater la disparition complète de la bande I alors que la bande A reste en place (photographie 43).

La viande commence alors à dégager une odeur de putréfaction. Cependant on peut observer, malgré cet état très avancé de décomposition, des mitochondries (photographies 38 et 42). Très souvent leurs crêtes sont encore visibles.

- Comme le montre les microphotographies électroniques, les bactéries sont très nombreuses. On peut observer des différences dans les parois (photographie 39) ou parfois la présence d'expansions à la surface de la cellule (photographies 45 et 46). Il faut encore une fois signaler que malgré le nombre de coupes observées, les levures n'ont jamais été vues dans le muscle.

CONCLUSIONS

Les trois techniques utilisées ont prouvé que les levures ne pénétraient pas à l'intérieur des paquets de fibres musculaires. Cependant elles se développent à la surface de ces dernières , comme le prouve l'observation en microscopie électronique à balayage. Elles semblent aussi influencer sur la composition quantitative et qualitative de la flore bactérienne.

Cette absence de pénétration et apparemment l'absence d'action directe sur les protéines des muscles, constituants importants, sinon essentiels des saucisses, pâtés et autres produits similaires, nous a conduit à nous poser plusieurs questions :

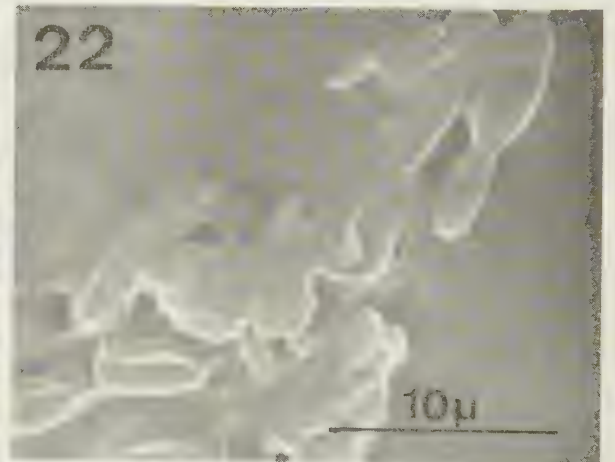
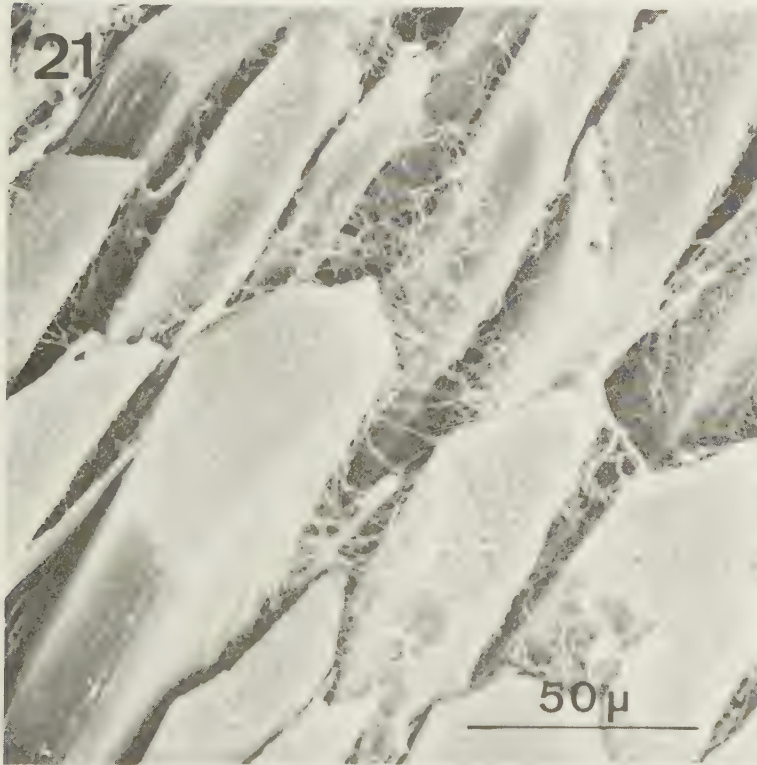
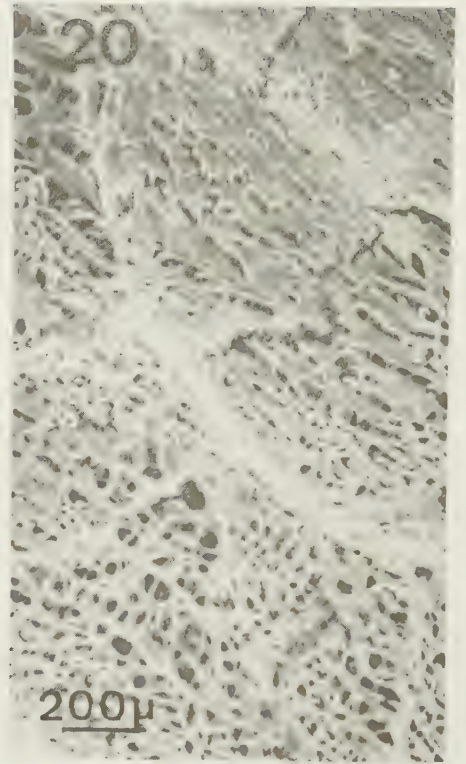
- Le potentiel enzymatiques de levures isolées n'est-il pas suffisant pour dégrader les protéines? La même question se pose pour les lipides.
- Le développement des levures est-il inhibé?
- Les levures ont-elles une action directe ou indirecte sur les bactéries présentes dans les produits carnés?

Nous tenterons de répondre à ces questions dans les chapitres suivants.

Photographies 19-21-24 : Paquets de fibres musculaires reliés par du tissu conjonctif réduit à l'état de fibrilles par la dessiccation.

Photographie 20 : Aspect d'ensemble de la viande témoin.

Photographies 22 et 23 : Levures se développant à la surface de la viande.

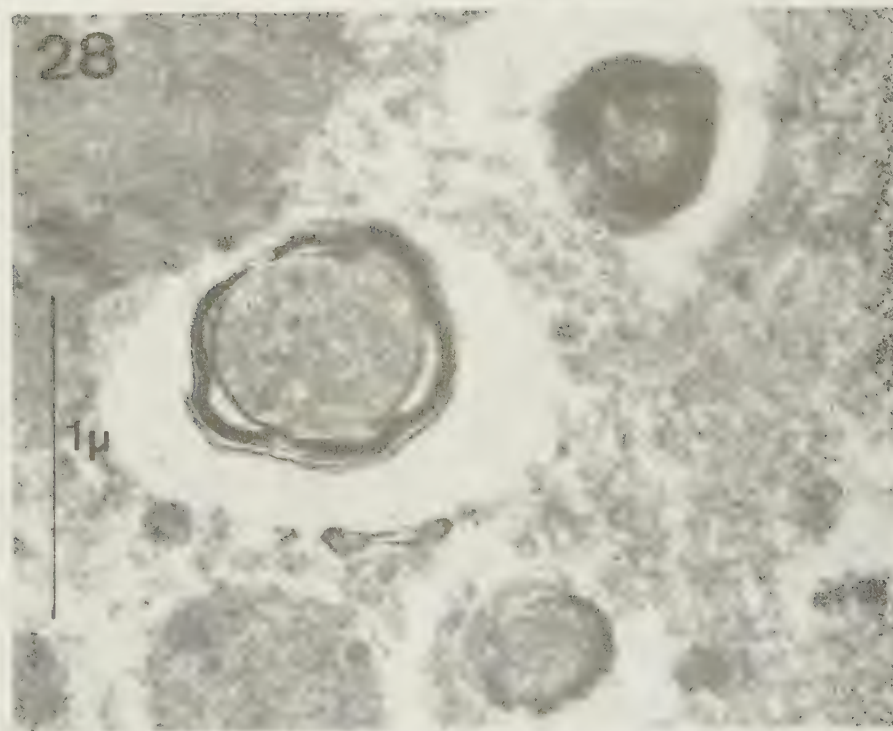
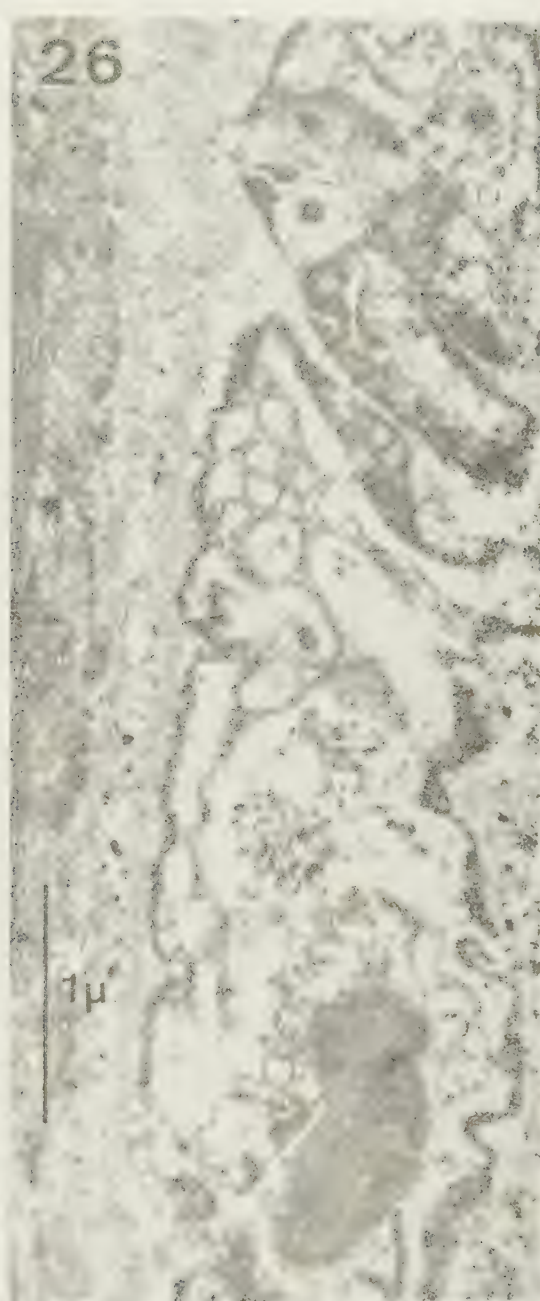


Photographie 25 : Paquet de myofibrilles.

Photographie 26 : Noyau avec nucléol' et chromatine.

Photographie 27 : Tissu conjonctif plus ou moins granuleux à coté des fibres.

Photographie 28 : Coupes transversales d'axones myélinisés.

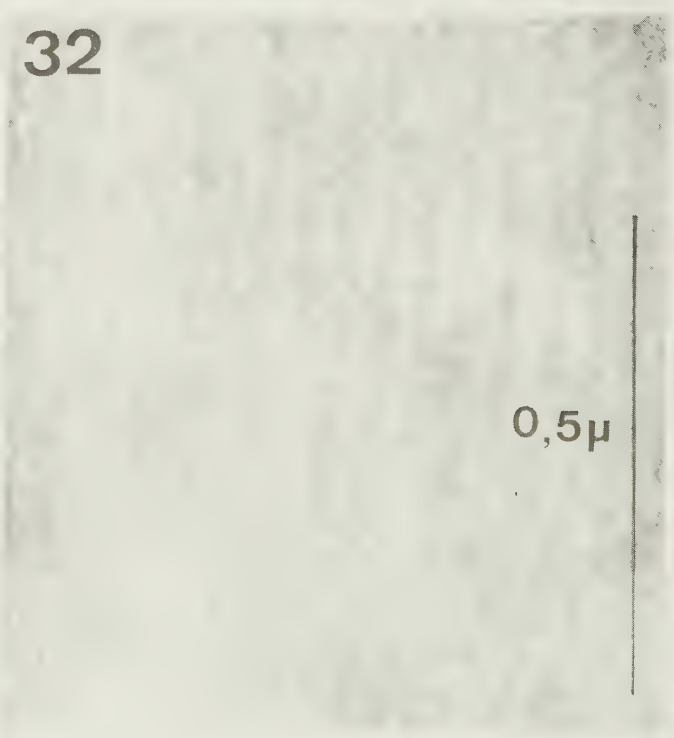
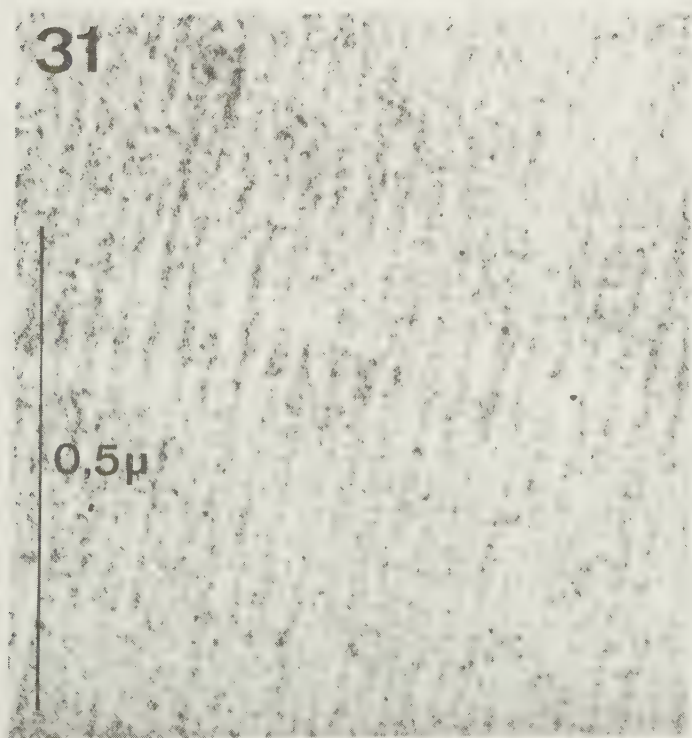
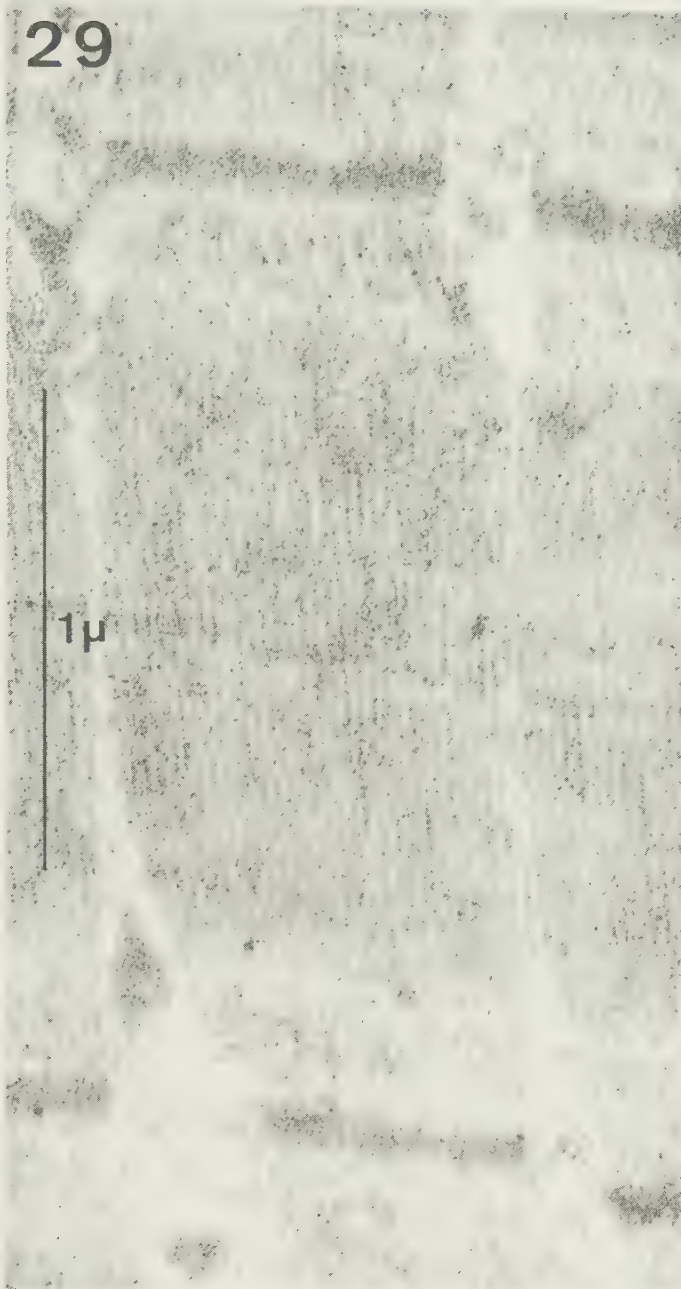


Photographie 29 : Témoin montrant les bandes I, A, H et les stries Z et M intactes.

Photographie 30 : Disparition progressive de la bande H.

Photographie 31 : La bande H encore visible s'atténue.

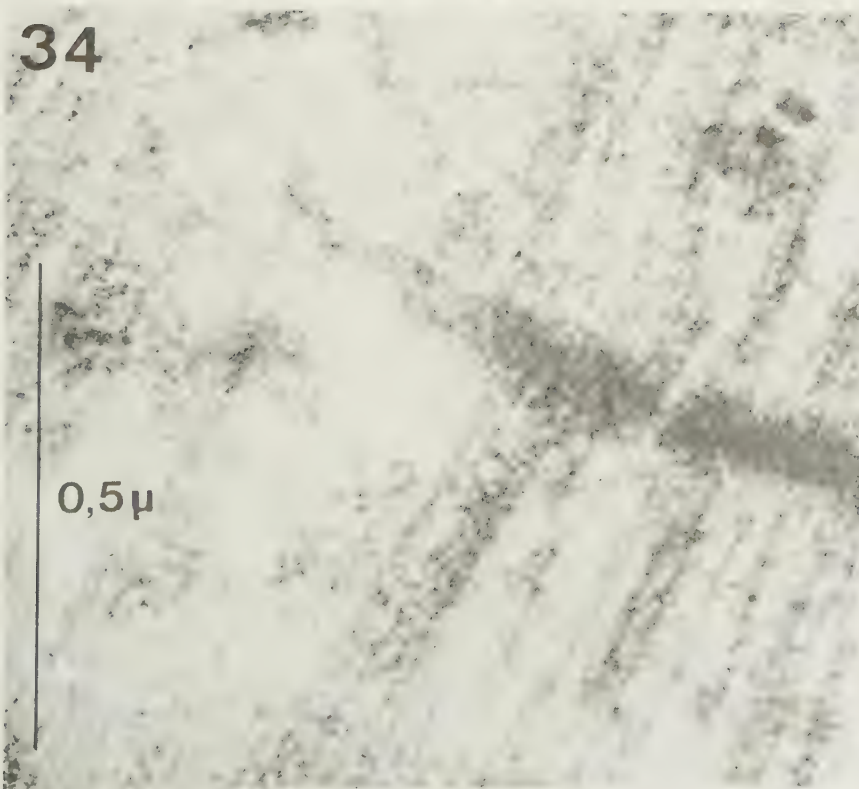
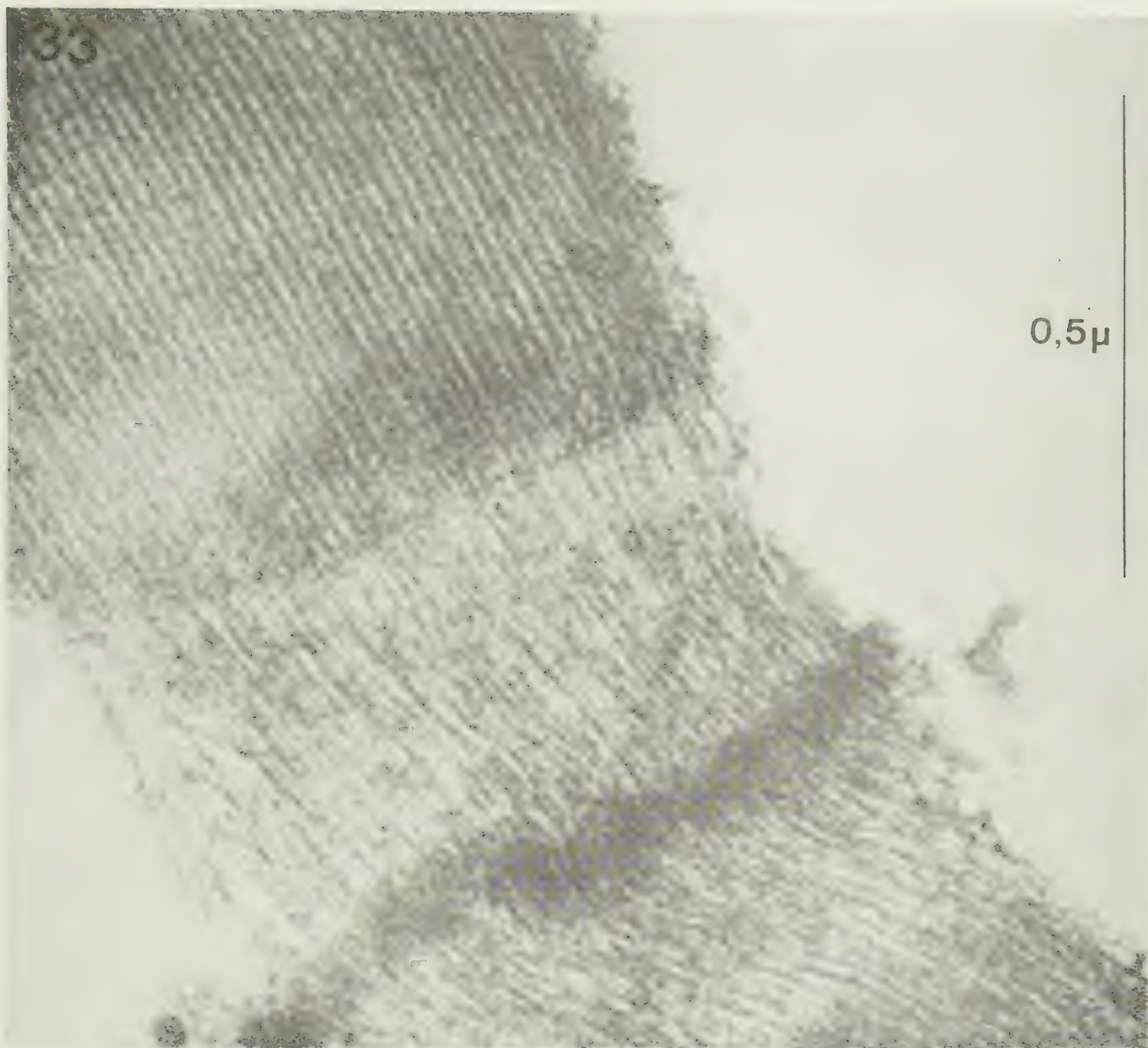
Photographie 32 : Disparition complète de la bande H.



Photographie 33 : Désagrégation de la bande I. Les fibrilles se déchirent avant la disparition de la ligne Z.

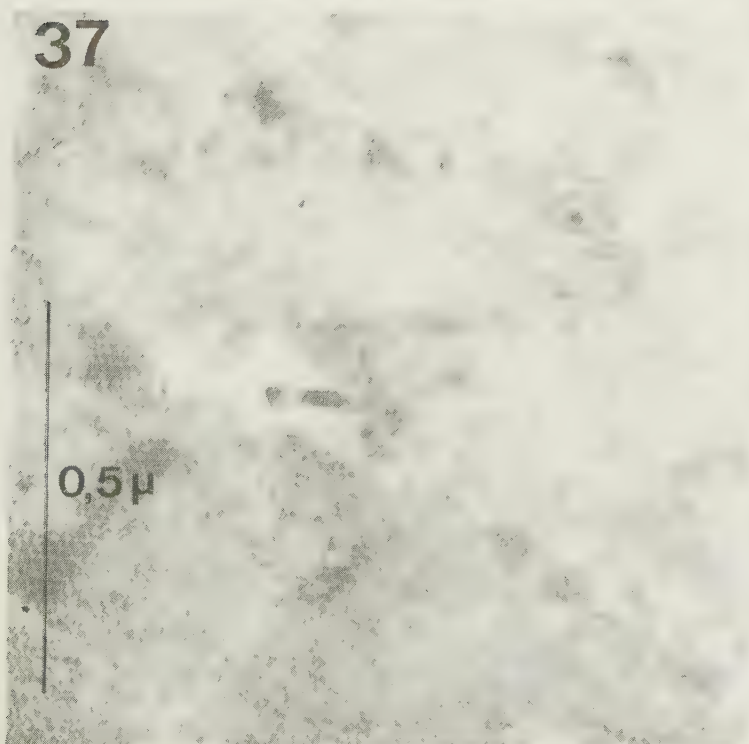
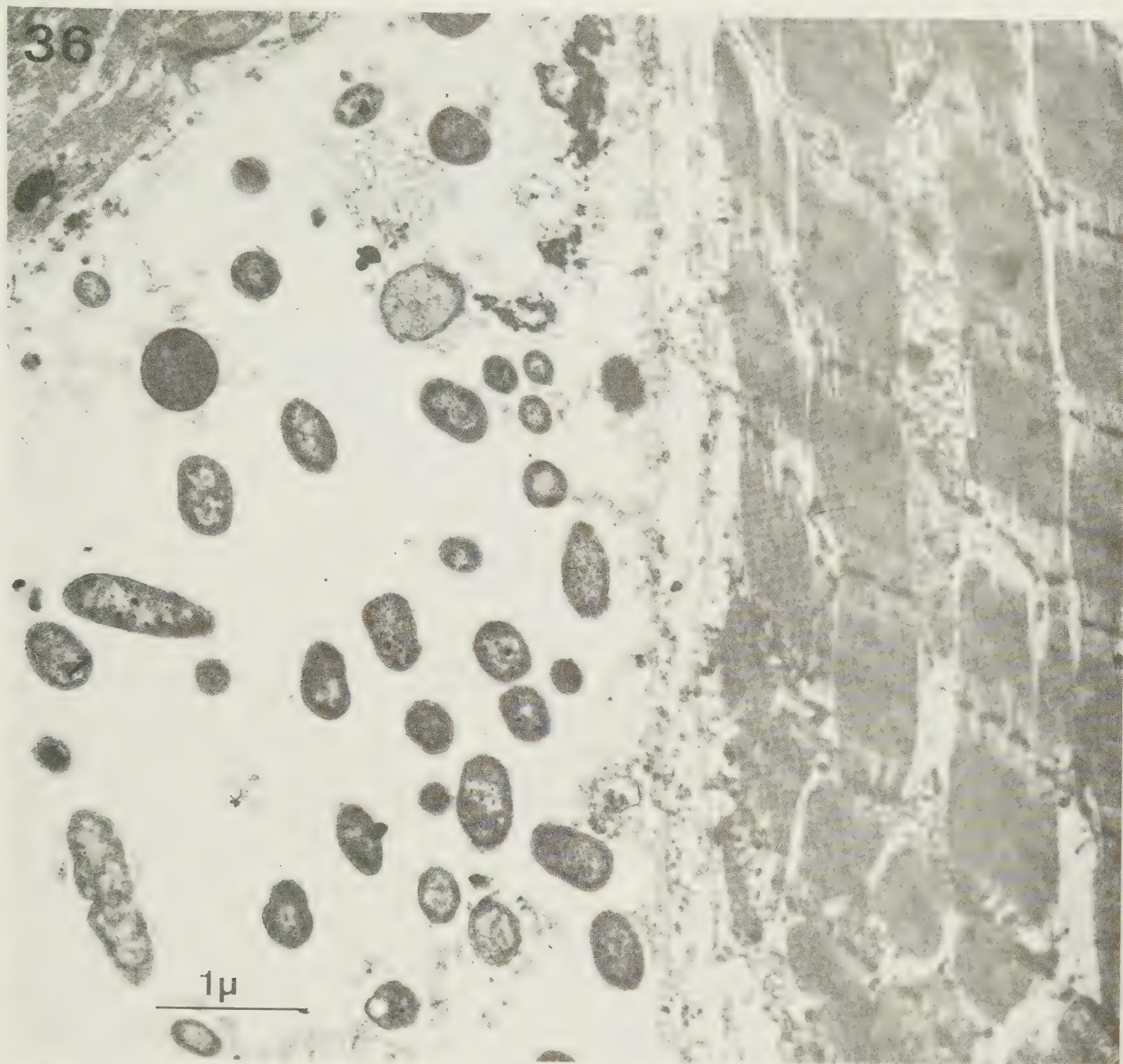
Photographie 34 : Désagrégation plus importante des fibrilles de la bande I et disparition partielle de la strie Z.

Photographie 35 : Stade ultime de désagrégation de la bande I observé au cours de nos expériences.



Photographie 36 : Bactéries en nombre élevé entre les paquets de fibrilles.

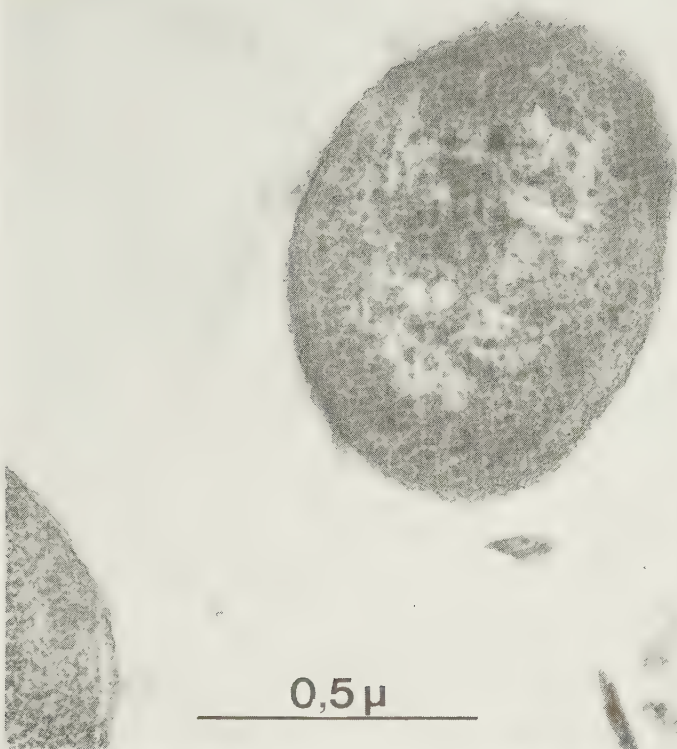
Photographies 37 et 38 : Séparation des paquets de fibres.
Mitochondries (M) avec crêtes.



Photographies 39 et 40 : Bactéries s'attaquant aux fibrilles.

Photographies 41 et 42 : Myofibrilles désagrégées et perdant leur disposition parallèle.

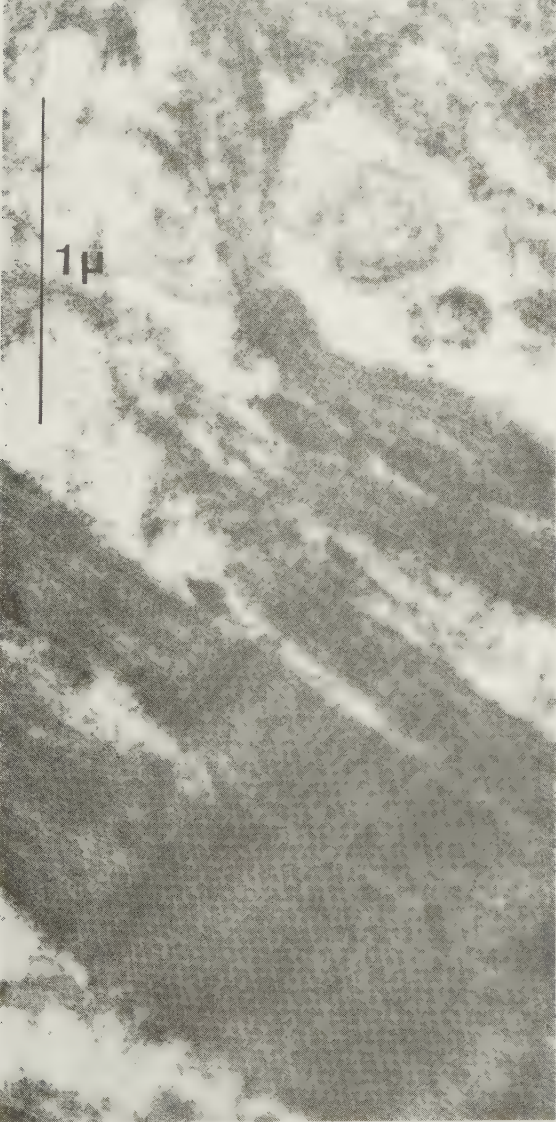
39



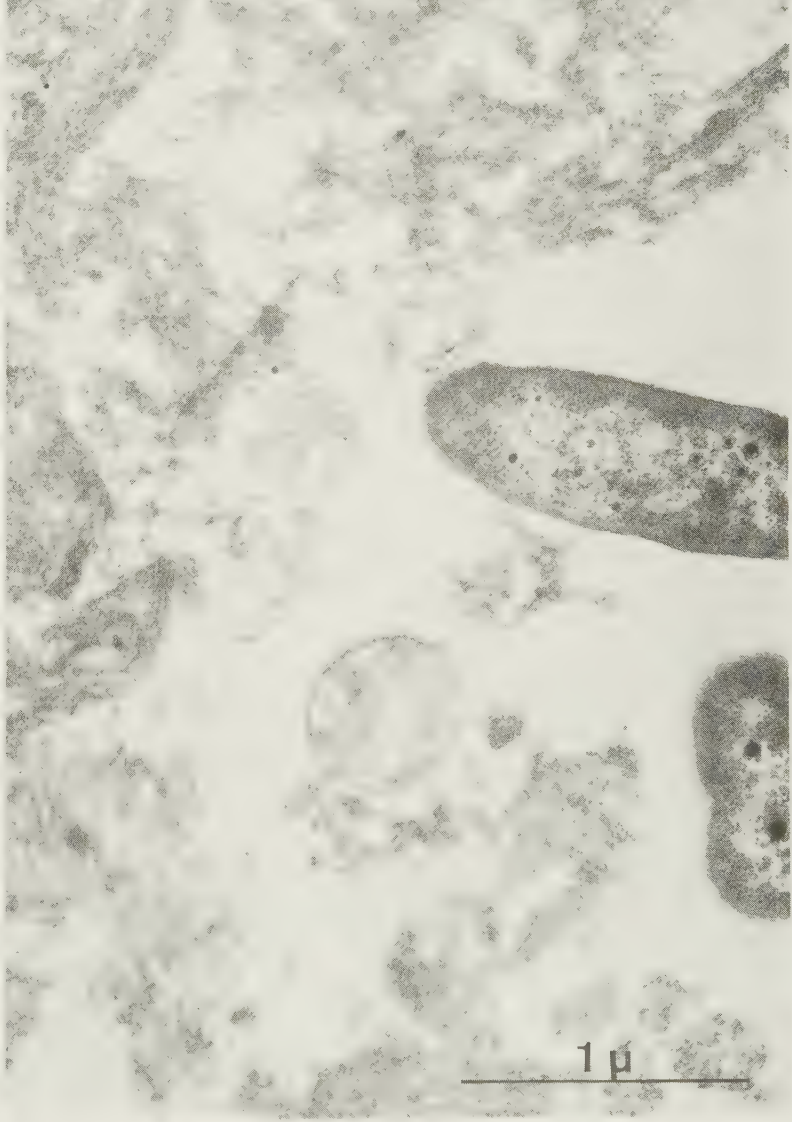
40



41

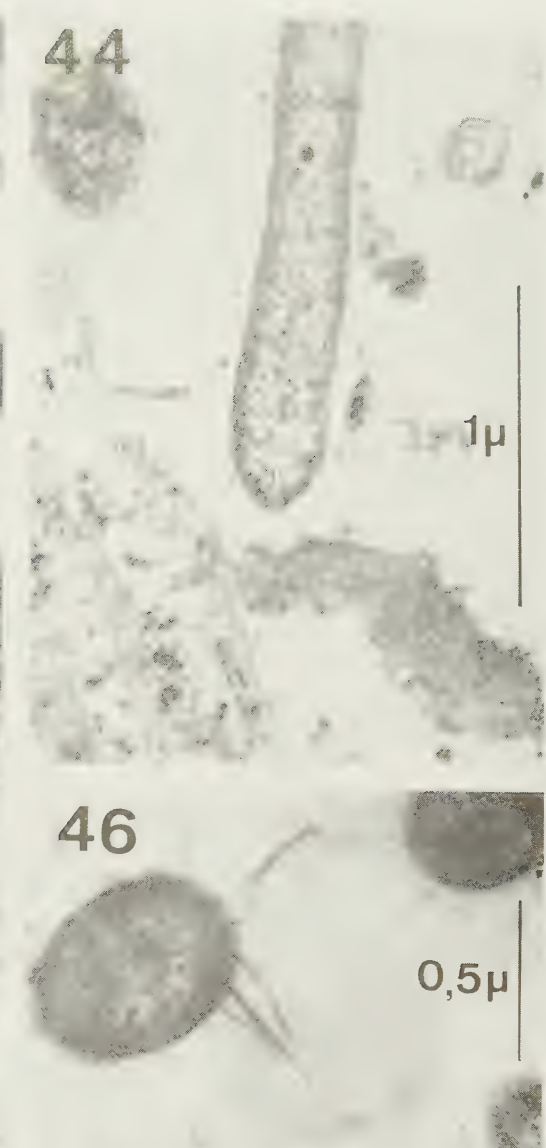
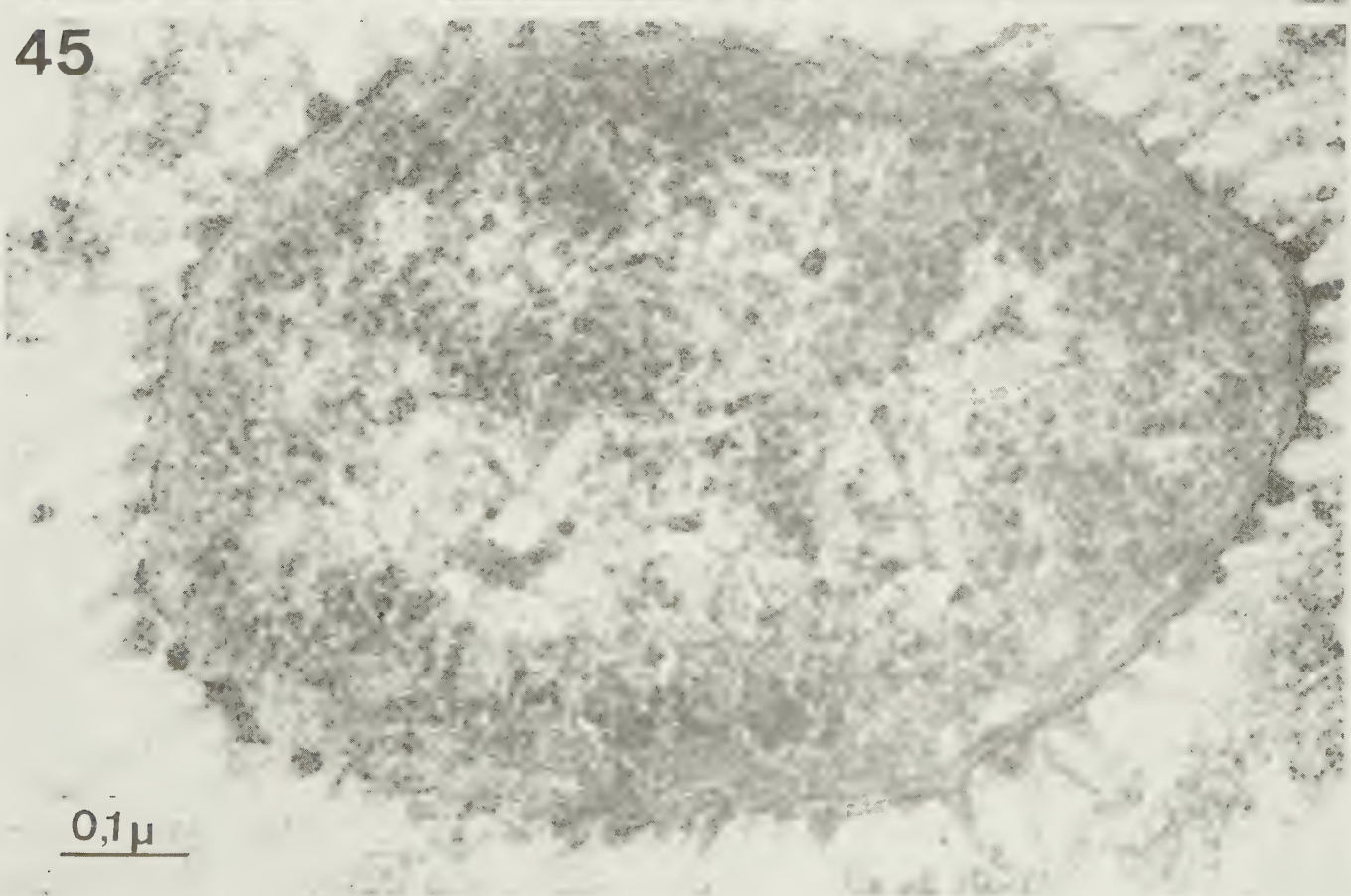
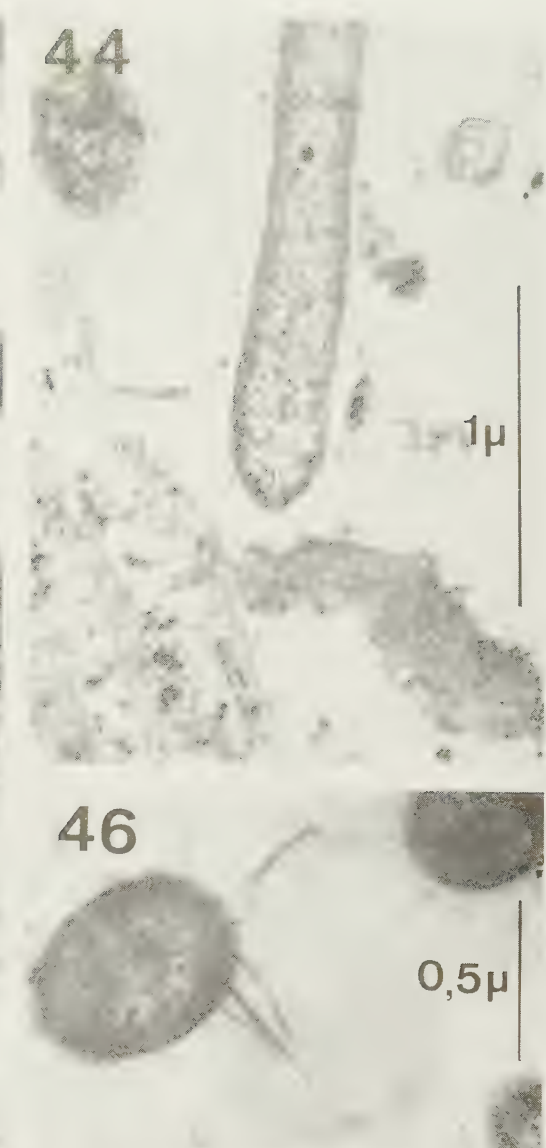
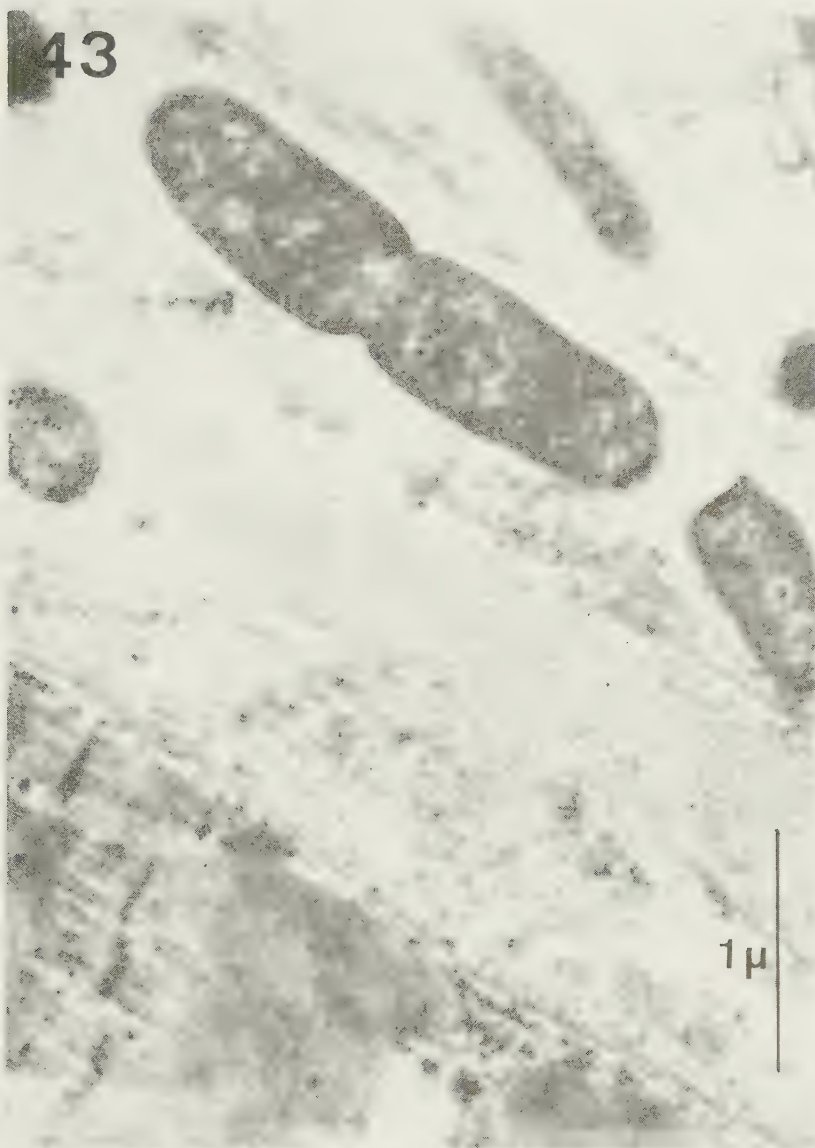


42



Photographies 43 et 44 : Bactéries au voisinage des fibrilles. Le cytoplasme granuleux disparaît partiellement.

Photographies 45 et 46 : Bactéries avec expansions filamenteuses.



CHAPITRE III

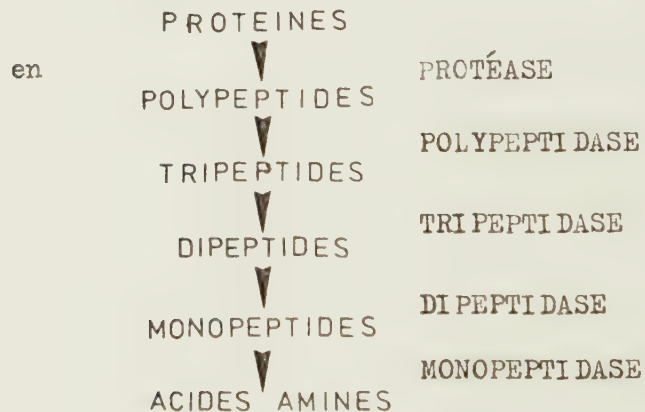
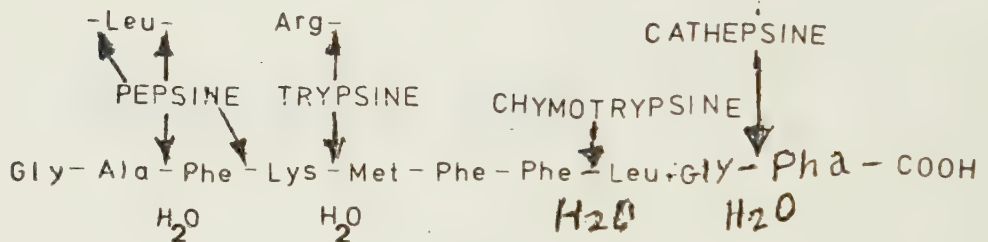
ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES LEVURES

Les enzymes protéolitiques sont classées en deux groupes selon leur mode d'action :

- Endopeptidases : attaquent les liaisons peptidiques au centre de la molécule . Ce sont les pepsines, les trypsines, les chymotrypsines, les cathepsines et les rennines (= ferment de la présure).

- Exopeptidases : rompent l'extrémité de la molécule de protéine. Ce sont les carboxypeptidases A, B et les aminopeptidases.

Ces enzymes scindent les :



Les Congrès internationaux de biochimie de l'enzyme (1964 et 1972, révision des numéros de code) ont donné à

ces hydrolases la dénomination de "Peptidyls peptides hydrolases 3.4." et ont attribué aux principales enzymes protéolytiques un numéro de code(1972) :

Pepsine : 3.4.23.1. Trypsine : 3.4.21.4.

Chymotrypsine: 3.4.4.5. Papaïne : 3.4.4.10.

Les compositions chimiques des enzymes protéolytiques sont complexes.

Les levures possèdent des enzymes protéolytiques extracellulaires et intracellulaires (du fait de la lyse de l'enveloppe cellulaire l'enzyme intracellulaire peut diffuser dans le milieu) qui lysent les liaisons peptidiques.

Les protéases des microorganismes ressemblent aux enzymes des animaux et des plantes mais leurs spécificités sont moindres (BOYER et al 1960, DIXON et WEBB 1965, CORP et WINTER 1972, ROECK et al 1970, BARMAN 1974).

L'activité protéolytique des levures sur les produits alimentaires varie selon plusieurs facteurs : l'état et la nature de ces produits, les conditions du milieu, etc....

Nous avons utilisé plusieurs substrats, holoprotéines et hétéroprotéines, à des températures différentes, pour tenter de connaître l'influence des levures sur l'altération des produits alimentaires au cours de leur conservation.

MATERIEL ET METHODES

I. MICROORGANISMES

Ce sont les levures citées dans le chapitre I.

II. MILIEUX DE CULTURE.

Au cours de cette étude nous avons utilisé la gélatine, la caséine et la poudre acétonique de viande.

a) Milieu à base de caséine.

Caséinate de sodium.....	10g	
CaCl ₂	0,6g	
NaCl.....	2g	pH : 7
Eau distillée.....	1000ml	
Gélose.....	14g	

Ce milieu est stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 25 minutes, puis réparti à raison de 20ml par boîte.

b) Milieu à base de poudre acétonique de viande.

Après avoir enlevé toutes les parties non musculaires, le muscle est haché grossièrement, puis finement broyé dans un homogénéisateur Sorvall en présence d'acétone froide. On complète ensuite le volume d'acétone à 4°C pour avoir deux volumes d'acétone dans un volume de muscle. On filtre et on élimine le filtrat. On lave ensuite trois fois avec de l'acétone à 4°C et on filtre. On répète la même opération avec de l'éther sulfurique à 4°C (2 lavages). Le filtrat est alors limpide.

à vide (DESSIN)

(BERNARD)

Après séchage on passe la poudre obtenue au broyeur à bille et on tamise (Tamisoir : diamètre des mailles 0,200mm).

Enfin on homogénéise la poudre dans un broyeur à billes en présence d'acétone, puis on la sèche sous vide.

Le milieu est fabriqué de la manière suivante :

- Afin de dénaturer le moins possible les protéines, on stérilise durant 90 minutes à 60°C dans un appareil Stérivit (oxyde d'éthylène), 8g de poudre acétonique. Ensuite on mélange cette dernière à 150ml d'eau stérile.

- D'autre part, nous avons préparé le mélange suivant dans 850ml d'eau distillée :

CaCl₂.....0,6g
 Extrait de levure.....3g
 NaCl.....2g pH : 7
 Glucose.....2g
 Gélose14g

Après stérilisation à 120°C durant 15 minutes , nous avons laissé descendre la température à 60°C , puis mélangé ce milieu avec la suspension de poudre acétonique. On coule ensuite directement en boîte à raison de 20ml par boîte .

c) Milieu à base de gélatine

La composition de ce milieu est la suivante :

Gélatine40g
 NaCl.....5g
 Gélose20g
 Eau distillée.....1000ml

L'ensemble est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes, puis coulé en boîtes de Pétri (20ml).

III. INCUBATION ET LECTURE DES RESULTATS.

Les boîtesensemencées sont incubées pendant 20 jours à 5°C ou à la température ambiante.

Pour les trois milieux, le diamètre de la zone de lyse est mesuré tous les jours à partir du deuxième jour.

RESULTATS

I. HYDROLYSE DE LA CASEINE

a) Température ambiante (Tableau 6)

Parmi les 16 souches utilisées quatre sont particulièrement actives : T. candida, C. melinii, C. zeylanoides et T. pullulans. Les enzymes secrétées par ces espèces hydrolysent en deux semaines toute la caséine contenue dans la boîte de culture.

Deux espèces (Saccharomyces sp et T. aeria) donnent une zone claire moins étendue et ne commencent à agir qu'à partir du 11^e jour. Ce phénomène est certainement dû à la lyse cellulaire et à la libération de protéases contenues dans la cellule. Pour les dix levures restantes, nous n'avons pas noté de zone de lyse pendant toute la période d'incubation.

b) 5°C (Tableau 6)

L'activité protéolytique est moins importante qu'à la température ambiante. Cependant , il est intéressant de noter que quatre souches gardent encore une activité appréciable à basse température : T. candida, C. melinii, C. zeylanoides et T. pullulans. Cependant, la zone de lyse n'apparaît qu'à partir du 10^e jour et son diamètre ne dépasse jamais 13mm.

II. HYDROLYSE DE LA POUDRE ACETONIQUE DE VIANDE.

a) Température ambiante (Tableau 7).

Cinq souches seulement ont dégradé ce substrat qui contient de l'actine, de la myosine et de la myofibrine.

C. melinii est la souche la plus active. Son action débute dès le troisième jour et à la fin de l'expérience, le diamètre de la zone de lyse atteint 18mm.

T. pullulans commence à agir au quatrième jour mais le diamètre de lyse ne dépasse pas 15mm.

C. zeylanoides a la même activité protéolytique que T. pullulans mais l'action commence au 5^e jour et se montre donc un peu plus rapide.

T. candida ne provoque de zone claire qu'à partir du 11^e jour et à la fin de la période d'incubation le diamètre de la zone de lyse est de 4mm, alors qu'il n'est que de 3mm pour C. rugosa dont le début d'activité se situe au 14^e jour.

Pour les 11 souches qui restent, nous n'avons pas noté de lyse dans les boîtes de Pétri pendant toute la période d'incubation.

b) 5°C (Tableau 7).

Nous avons pu constater que trois souches seulement donnaient des résultats positifs et ceci uniquement à partir du 14^e jour : C. melinii (2mm), C. zeylanoides (4mm) et T. pullulans (3mm). Ces trois levures sont aussi celles qui sont les plus actives à la température ambiante.

111. HYDROLYSE DE LA GELATINE .

a) Température ambiante (Tableau 8).

Quatre espèces seulement sont capables de provoquer la gélatinolyse. Ce sont :

- C. melinii qui au 14^e jour hydrolyse tout le milieu de la boîte.
- T. candida qui provoque une zone de lyse de 20mm de diamètre après 20 jours d'incubation.
- C. zeylanoides qui lyse toute la gélatine de la boîte après 20 jours.
- T. pullulans qui dégrade toutes les protéines du milieu à la fin de la durée d'incubation.

Les douze autres espèces ne provoquent aucunes modifications du milieu .

b) 5°C (Tableau 8)

Ce sont les mêmes espèces qui agissaient précédemment qui provoquent la gélatinolyse du substrat à 5°C. Ce sont C. zeylanoides qui commence à agir au 9^o jour (Zone de lyse : 11mm), C. melinii au 11^o jour (9mm), T. pullulans au 12^o jour (8mm). T. candida a lui une faible action protéolytique qui ne se manifeste qu'à partir du 15^o jour et le diamètre de la plage dégradée ne dépasse pas 3mm à la fin de l'expérience.

CONCLUSIONS

Les résultats généraux sont consignés dans le tableau récapitulatif n° 9 .

Exception faite de Saccharomyces sp , T. aeria (caséine à la température ambiante uniquement) et C. rugosa (poudre acétonique à la température ambiante) les souches hydrolysant l'un des substrats utilisés, agissent également sur les deux autres.

A la température ambiante cette action est très efficace et très souvent toutes les protéines contenues dans le milieu sont dégradées à la fin de l'expérience.

A 5°C, température du réfrigérateur, durant la même période, l'activité est moindre mais encore sensible.

Sur les 16 souches utilisées, seules 4 espèces hydrolysent activement les protéines: C. melinii, C. zeylanoides, T. candida et T. pullulans . Ces germes sont capables de modifier la nature du substrat, ce qui peut faciliter une action ultérieure de germes pathogènes ou non.

Tableau 9 : Récapitulation. Hydrolyse de la gélatine, de la caséine et de la poudre acétonique de viande à la température ambiante et à 5°C. Les chiffres correspondent au diamètre maximum en mm de la zone de lyse. T: toute la substance contenue dans la boîte a été lysée. T°: température ambiante.

Températures Levures	Caséine		P. de viande		Gélatine	
	5°C	T°	5°C	T°	5°C	T°
<u>S. acidifaciens</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Saccharomyces sp</u>	-	3	-	-	-	-
<u>H. subpelliculosa</u>	-	-	-	-	-	-
<u>D. kloeckeri</u>	-	-	-	-	-	-
<u>D. subglobosus</u>	-	-	-	-	-	-
<u>T. candida</u>	7	T	-	4	3	20
<u>T. aeria</u>	-	8	-	-	-	-
<u>T. versatilis</u>	-	-	-	-	-	-
<u>T. magnolia</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C. melinii</u>	9	T	2	18	9	T
<u>C. zeylanoides</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C. lipolytica</u>	-	-	-	3	-	-
<u>C. rugosa</u>	13	T	4	15	11	T
<u>T. pullulans</u>	10	T	3	15	8	T
<u>R. mucilaginoso</u>	-	-	-	-	-	-
<u>R. glutinis</u>	-	-	-	-	-	-

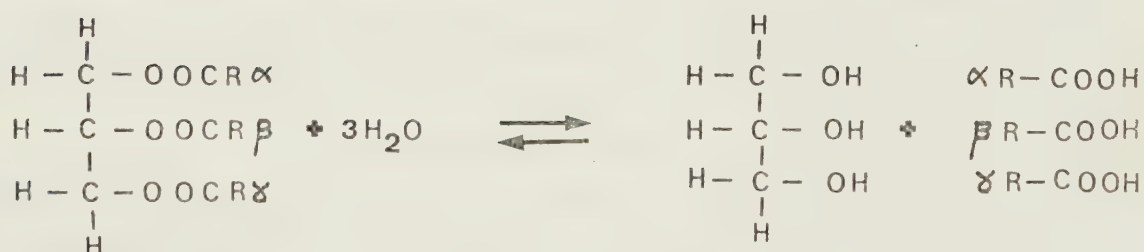
CHAPITRE IV

ACTIVITE LIPOLYTIQUE DES LEVURES

Cette activité peut revêtir une très grande importance, en particulier lorsque les produits à base de viande contiennent des quantités importantes de lipides.

Avant d'en arriver à nos expériences, nous rappellerons brièvement quelques notions indispensables sur les lipides.

Les graisses d'origine animale sont des substances composées essentiellement d'un mélange de triglycérides, c'est à dire de glycérol estérifié par trois résidus d'acides gras saturés ou non. On obtient ainsi dans le cas de l'acide butyrique, la tributyrine. Dans le cas des graisses d'origine végétale l'acide oléique donne la trioléine, tandis que, le plus souvent les résidus acides sont différents et donnent des triglycérides mixtes .



Parmi les enzymes lipolytiques des levures, on peut distinguer les lipases et les estérases, intracellulaires ou extracellulaires. La différence essentielle entre ces deux types d'enzymes réside dans le fait que les lipases attaquent des substrats en émulsion comme par exemple la tributyrine, tandis que les estérases hydrolysent les substances en solution telles que certains tweens.

Bien que dépourvue de spécificité stricte, on peut classer les lipases (^{E.C.} 3.I.1.3) des microorganismes en trois groupes (SARDA et DESNELLE 1969) :

- Les lipases du premier groupe possèdent les caractéristiques de la lipase pancréatique, en particulier la capacité d'hydrolyser préférentiellement les chaînes externes des triglycérides.
- Les lipases du deuxième groupe n'ont pas de spécificité de position. Elles hydrolysent les chaînes externes et internes à la même vitesse.
- Les lipases du troisième groupe manifestent une spécificité pour les chaînes oléiques (acides gras insaturés).

E.C.

Les estérases (3.I.1.1.) comme nous l'avons déjà dit plus haut hydrolysent des substrats en solution et possèdent une spécificité encore beaucoup plus large que les lipases. En fait ces dernières ne sont qu'un type d'estérases

Ces différentes enzymes provoquent la libération d'acides gras entraînant l'apparition d'odeurs et de goûts désagréables dans les matières grasses, cela étant dû spécialement aux acides gras à chaînes courtes.

Un autre type d'altération, appelé rancissement oxydatif par certains auteurs, est comme son nom l'indique, de nature oxydative et porte sur les acides gras insaturés. Il y a dans ce cas production de peroxydes, d'aldéhydes et de cétones. Ce phénomène est surtout d'ordre chimique mais les lipoxygénases d'origine microbienne peuvent également intervenir. Ceci ne fait pas l'objet de notre étude car nous nous sommes limités à l'action des estérases et des lipases des levures.

Ainsi, il apparaît, à la lumière de ce que nous venons de dire qu'il semble intéressant d'examiner en même temps l'action des estérases et des lipases sur les graisses animales, puisque si les enzymes sont différentes, l'effet est le même et conduit au rancissement du produit alimentaire.

Nous désignerons cette action globale due aux estérases et aux lipases ou à l'une seulement de ces enzymes par le terme de lipolyse. De ceci nous pouvons tirer la conséquence suivante : la diversité des substrats préférentiels nous amène à ne pas nous limiter à un ^u sel milieu pour notre étude mais au contraire à les multiplier, ceci pour obtenir une meilleure image de ce qui se passe en réalité. Il est toutefois nécessaire de faire un choix dans les multiples possibilités qui nous sont offertes et nous avons décidé de nous tenir aux méthodes classiques qui ont fait leurs preuves.

Pour la détection des estérases des levures nous avons pris les tweens 20,40,60 et 80, substrats synthétiques qui sont faciles à utiliser (SIERRA 1957).

Pour la recherche des lipases nous utilisons un milieu contenant de la tributyrine et dont l'émulsion est stabilisée à l'aide d'alcool polyvinylique (MOUREY et KILBERTUS 1975).

Enfin nous ferons une mention spéciale pour le tween 85, substrat synthétique qui donne dans le milieu de culture des émulsions stables. Le fait que cette substance soit en émulsion permet de penser (PERNICE et ALONZO 1969) que l'activité enzymatique détectée sera une activité de type lipase agissant sur les liaisons esters d'acides gras à chaînes longues (acide oléique). Il ne faut pas oublier cependant que ce substrat est artificiel.

En résumé, nous aurons donc une vue d'ensemble sur les possibilités lipolytiques des divers isolats de levures étudiées :

- Possibilités lipolytiques de type estérase sur des liaisons avec des acides gras saturés à longueur de chaîne moyenne avec le tween 20, ou à chaînes longues avec les tweens 40 et 60 ou encore liaison ester avec acides gras insaturés à chaînes longues dans le cas du tween 80.
- Possibilités lipolytiques de type lipase grâce à la tributyrine substrat à acide gras à chaînes courtes et au tween 85, substrat à acide gras à chaînes longues et insaturées.

MATERIEL ET METHODES

I. MICROORGANISMES

Ce sont les levures citées dans le chapitre I. Elles sont au préalable cultivées sur malt gélosé.

II. MILIEUX DE CULTURE

Pour mettre en évidence l'activité lipolytique des levures nous avons utilisé les milieux préconisés par ARCHIBALD (1946), SIERRA (1957) et MOUREY et KILBERTUS (1975).

Les substrats à hydrolyser sont les tweens 20,40,60,80 et 85 ainsi que la tributyrine.

a) Tweens

Le milieu de base est le suivant :

Peptone.....	10g	
NaCl.....	5g	
CaCl ₂	0,4g	pH: 7
Tween.....	10ml	
Eau distillée.....	1000ml	

Dans le cas du tween 85 il est nécessaire d'utiliser un mixeur jusqu'à l'obtention d'une émulsion laiteuse homogène stable, car contrairement aux autres tween, celui-ci est insoluble dans l'eau.

On ajoute ensuite 15g de gélose par litre et on stérilise l'ensemble à 120°C durant 20 minutes. On répartit ensuite des fractions de 20ml par boîte de Pétri.

Les résultats sont caractérisés par l'apparition d'un précipité blanc dû à la formation d'un sel insoluble, les

ions Ca^{++} se combinant avec les acides gras libérés lors de l'hydrolyse des tweens (CAILLAT 1970, PERNICE et ALONZO 1969).

Les tweens utilisés permettant la mise en évidence de l'estérase (tweens 20,40,60 et 80) et de la lipase (Tween 85) sont les suivants :

- Tween 20 CI2 saturé
- Tween 40 CI6 saturé
- Tween 60 CI8 saturé
- Tween 80 CI8 non saturé à la double liaison 9-10
- Tween 85 non saturé, ester trioléique.

b) Tributyryne

Ce milieu à la tributyrine stabilisée permet également de mettre en évidence l'activité lipase. Sa composition est la suivante :

Extrait de viande	5g	
Peptone.....	10g	
NaCl.....	5g	
Extrait de levure.....	3g	pH : 7
Tributyryne.....	10ml	
Alcool polyvinylique.....	1g	
Eau distillée.....	1000ml	

Le tout est mélangé à l'aide d'un mixeur jusqu'à l'obtention d'une émulsion stable. Après avoir amené le pH à 7 on ajoute 15g de gélose et on stérilise 20 minutes à 120°C.

On répartit ensuite en boîtes de Pétri (20ml par boîte).

L'hydrolyse de la tributyrine se traduit par un éclaircissement du milieu dû au fait que dibutyryne et glycérol sont solubles dans *le milieu*.

III. TECHNIQUE DE CULTURE.

Pour chaque levure nous avons utilisé trois boîtes de chaque milieu. L'ensemencement se fait en ligne selon le diamètre de la

boite. Chaque jour, du deuxième au vingtième, nous avons mesuré la largeur de la zone de lyse autour de la colonie. L'expérience a été répétée une deuxième fois.

Les températures d'incubation sont :

- 5°C c'est à dire la température moyenne d'un réfrigérateur
- la température ambiante.

Ces températures nous ont semblé en relation avec celles habituellement utilisées lors de la conservation des produits carnés par les consommateurs. L'activité lipolytique des levures, dans ces conditions, sera le reflet plus exact de l'activité réelle dans les produits alimentaires.

RESULTATS

Les résultats de nos expériences sont consignées dans les tableaux de 10 à 15.

I. TWEEN 20 (Ester mono-laurique) $C_{11}H_{23}COOR$

a) Température ambiante (Tableau 10).

Il est hydrolysé par la moitié des espèces étudiées. Parmi ces huit organismes l'activité est très variable. Les souches les plus efficaces appartiennent aux Rhodotorula (dans l'ordre R. glutinis et R. mucilaginosa) suivies par D. kloeckeri et C. lipolytica . Par contre D. subglobosus , T. pullulans et C. melinii n'ont hydrolysé que très peu le tween 20

Dans certains cas (Trichosporon), après avoir libéré l'enzyme, la colonie envahit progressivement la zone lysée sans qu'une nouvelle bande opaque apparaisse. Tout se passe comme si la production d'estérase était stoppée lors de l'utilisation des acides gras libérés.

b) 5°C (Tableau 10).

Seuls C. lipolytica et C. zeylanoides donnent des résultats positifs mais faibles et tardifs. Ce n'est qu'après quatre jours qu'apparaissent les premières auréoles.

II. TWEEN 40 (Ester mono-palmitique) $C_{15}H_{31}COOR$

a) Température ambiante (Tableau 11).

La dégradation du tween 40 aboutit à des résultats similaires à ceux du tween 20. Les mêmes phénomènes constatés pour C. melinii et T. pullulans se répètent. Cependant les deux espèces de Debaryomyces ont une activité différente : elle est plus réduite pour D. kloeceri et nulle pour D. subglobosus.

Il faut aussi signaler que les précipitations des acides gras avec les ions Ca^{++} sont moins intenses qu'avec le tween 20 avec les Debaryomyces et les Rhodotorula.

b) 5°C (Tableau 11)

Ce sont toujours C. lipolytica et C. zeylanoides qui réagissent.

III. TWEEN 60 (Ester mono-stéarique) $C_{17}H_{35}COOR$

Les résultats sont comparables à ceux des autres tweens (Tableau 12) Seules les cinq espèces les plus actives ont conservé une certaine efficacité.

IV. TWEEN 80 (Ester mono-oléique) $C_{17}H_{33}COOR$ (Tableau 13).

Les espèces appartenant aux genres Candida et Trichosporon présentent à nouveau une légère activité. On retrouve aussi des

souches qui envahissent progressivement la zone de lyse. Les résultats sont plus nets que pour le tween 60. Il faut savoir que l'acide oléique du tween 80 a une action stimulante et que ce tween est le mieux accepté par de nombreux microorganismes.

V. TWEEN 85 (Tableau I4).

Le problème de la réalisation d'une émulsion stable et uniforme des glycérides dans un milieu de culture est difficile et ne peut être résolu que par l'utilisation d'agents émulsifiants et stabilisants. Ceci a amené de nombreux auteurs à utiliser, pour détecter l'activité lipolytique des microorganismes cultivés sur plaques de gélose, des substrats solubles dans l'eau et tout particulièrement les tweens. Or comme nous l'avons déjà dit, ces substrats en solution détectent une activité estérase qui a souvent été confondue avec l'activité lipase vraie. C'est pour éviter cette confusion que PERNICE et ALONZO (1969) ont été amenés à proposer l'utilisation d'un tween insoluble dans l'eau, le tween 85, mais donnant dans les milieux une émulsion facile à réaliser et stable.

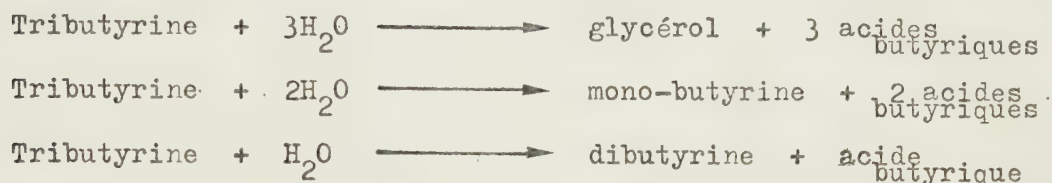
Dans ces conditions il est donc tout à fait normal que les résultats obtenus ne soient pas exactement comparables à ceux que l'on obtient avec le tween 80 dont la molécule comporte le même acide oléique.

Le problème principal posé par l'utilisation du tween 85 dans les milieux de culture pour la détection de l'activité des microorganismes réside dans le fait que dans la plupart des cas la précipitation des sels de calcium insoluble se superpose à l'émulsion du tween 85 dans le milieu. Cela entraîne quelques difficultés pour la lecture des résultats.

On peut constater (Tableau I4) que l'on détecte moins de souches donnant des résultats positifs que dans le cas du tween 80. Les résultats se rapprocheraient plutôt de ceux des autres tweens.

VI. TRIBUTYRINE (Tableau 15)a) Température ambiante

Cette fois c'est l'apparition d'une auréole claire qui permettra d'observer la sécrétion des lipases hydrolysant la tributyrine selon la formule :



Toutes les souches sont actives à des degrés différents, mais l'activité apparaît plus ou moins tardivement. On peut classer les levures en deux catégories :

- auréoles de 2 à 7mm de diamètre : 12 souches (tableau).
- auréole de 10mm et plus : D. kloeckeri, C. lipolytica, R. mucilaginosa et R. glutinii.

Souvent pour les levures du premier groupe, il faut attendre de 7 à 10 jours avant d'apercevoir les premières auréoles (sauf T. candida, C. melinii, C. zeylanoides et T. pullulans).

Dans le second groupe on peut constater que l'effet est positif dès les premiers jours pour C. lipolytica mais plus tardif pour les autres.

b) 5°C

Trois souches ont lysé la tributyrine : C. lipolytica, C. zeylanoides et T. magnolia.

CONCLUSIONS

Comme le prouve les résultats du tableau récapitulatif (tableau I6) le nombre de levures donnant des résultats positifs à 5°C est réduit : C. zeylanoides, C. lipolytica et T. magnolia (dans le cas de la tributyrine qui donne à cette température le plus grand nombre de réponses positives). L'activité est faible et les auréoles ne dépassent que rarement 5mm de diamètre. La réponse aussi est tardive. Il faut attendre plus de 10 jours pour l'observer. Les aliments ne veront donc leurs lipides que faiblement ou non attaqués par les levures aux températures du réfrigérateur.

A température ambiante, seules quatre souches sont très actives à la fois sur les tweens et sur la tributyrine et peuvent provoquer des dommages importants : D. kloockeri, C. lipolytica, R. glutinis et R. mucilaginosa .

Les levures sont beaucoup plus nombreuses à attaquer la tributyrine que les tweens. Cela conduit certains auteurs à dire que la méthode à la tributyrine est plus sensible. Les expériences de CHAKRABARTY et al (1970) , de LYSENKO (1961) et de HENIER et al (1969) chez les Enterobacteriaceae confirment ces résultats. Les premiers ne rencontrent pas d'activité lipolytique chez ces germes en utilisant le tween 80 alors que les autres l'observent chez quelques germes de cette famille en utilisant la tributyrine. Il semble donc que l'utilisation de milieux à base de tributyrine soit une technique plus fine et permet de détecter des activités enzymatiques peu importantes. En apparence, les lipases des microorganismes sont plus souvent actives sur les acides gras à chaines carbonées courtes que sur ceux à chaines longues. Cela explique la sensibilité plus importante du milieu à la tributyrine.

A l'aide de cette technique nous obtenons des résultats comparables à ceux d'autres auteurs utilisant des techniques plus élaborées. LLOYD et al (1971) par exemple, ont démontré, en utilisant Candida lipolytica que l'activité estérase était très importante dans les cellules intactes, mais faible dans les milieux de culture.

L'aptitude lipolytique est aussi un critère taxonomique souvent utilisé en systématique bactérienne (EDDY 1962, EDDY et CARPENTER 1964, STANIER et al 1966, BAIRD PARKER 1963-1965, etc..) Cependant dans les conditions naturelles l'activité lipolytique de certaines bactéries se manifeste souvent de façon tardive et demeure limitée, de sorte que ces germes n'ont aucune chance de concurrencer les microorganismes très actifs dans les biotopes très particulier que sont les produits carnés.

Enfin les lipases peuvent être détruites par les protéases et cela peut limiter considérablement leur action lors de l'attaque d'un produit carné par les levures productrices de cette enzyme.

Tableau 10 : Hydrolyse du tween 20 à la température ambiante et à 5°C par les levures

Temps en jours		Diamètre de la zone de lyse en mm																
Levures		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20		
Température ambiante	<u>S. acidifaciens</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>Saccharomyces sp</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>H. subpelliculosa</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>D. kloeckeri</u>	-	-	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	17		
	<u>D. subglobosus</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	I	2	3	4	5	6	7		
	<u>T. candida</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>T. aeria</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>T. versatilis</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>T. magnolia</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>C. melinii</u>	-	-	-	I	I	I	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
	<u>C. zeylanoides</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>C. lipolytica</u>	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16		
	<u>C. rugosa</u>	-	-	-	-	-	I	2	3	4	5	6	7	8	9	13		
	<u>T. pullulans</u>	-	-	I	I	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
	<u>R. mucilaginoso</u>	-	I	2	3	4	5	6	7	8	9	11	13	15	17	23		
	<u>R. glutinis</u>	-	I	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14	16	18	25		
5°C	<u>C. lipolytica</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	1	5		
	<u>C. zeylanoides</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	2	4		
	<u>T. magnolia</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Tableau I2: Hydrolyse du tween 60 à la température ambiante et à 5°C par les levures.

Levures		Temps en jours																
		Diamètre de la zone de lyse en mm																
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20		
Température ambiante	<u>S. acidifaciens</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>Saccharomyces sp</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>H. subpelliculosa</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>D. kloeckeri</u>	-	-	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14		
	<u>D. subglobosus</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>T. candida</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>T. aeria</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>T. versatilis</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>T. magnolia</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>C. melinii</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>C. zeylanoides</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>C. lipolytica</u>	I	I	2	3	4	5	6	7	7	8	9	10	11	12	15		
	<u>C. rugosa</u>	-	-	-	I	2	3	4	4	5	8	8	8	9	10	13		
	<u>T. pullulans</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<u>R. mucilaginoso</u>	-	-	I	2	3	4	5	6	7	9	11	12	14	15	18		
	<u>R. glutinis</u>	-	-	I	2	4	5	7	8	9	10	12	13	15	16	18		
5°C	<u>C. lipolytica</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	2	2	4		
	<u>C. zeylanoides</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	I	3		
	<u>T. magnolia</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Tableau I4: Hydrolyse du tween 85 à la température ambiante et à 5°C par les levures.

Levures		Temps en jours		Diamètre de la zone de lyse en mm																
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20				
Température ambiante	<u>S. acidifaciens</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	3	3				
	<u>Saccharomyces sp</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3	3	3	3				
	<u>H. subpelliculosa</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	<u>D. kloeckeri</u>	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3	4	6	6	7	11				
	<u>D. subglobosus</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	<u>T. candida</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	<u>T. aeria</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	<u>T. versatilis</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	<u>T. magnolia</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3				
	<u>C. melinii</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	<u>C. zeylanoides</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	<u>C. lipolytica</u>	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	9	10	11	12	14				
	<u>C. rufosa</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	3	7				
	<u>T. pullulans</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	<u>R. mucilaginis</u>	-	-	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	17				
	<u>R. glutinis</u>	-	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	16				
5°C	<u>C. lipolytica</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	3				
	<u>C. zeylanoides</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	3				
	<u>T. magnolia</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

Tableau I5: Hydrolyse de la tributyrine à la température ambiante et à 5°C par les levures.

Temps en jours		Diamètre de la zone de lyse en mm																
Levures		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20		
Température ambiante	<u>S. acidifaciens</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	3	3		
	<u>Saccharomyces sp</u>	-	-	-	-	-	-	1	2	2	3	3	4	4	5	5		
	<u>H. subpelliculosa</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	2	2	2		
	<u>D. kloeckeri</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	3	4	5	10		
	<u>D. subglobosus</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	2	2	2		
	<u>T. candida</u>	2	3	4	5	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7		
	<u>T. aerea</u>	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	2	2	2	2	2		
	<u>T. versatilis</u>	-	-	-	-	-	-	1	2	2	3	3	3	3	3	3		
	<u>T. magnolia</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	2	2	2	2		
	<u>C. melinii</u>	-	1	2	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
	<u>C. zeylanoides</u>	-	1	2	3	4	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6		
	<u>C. lipolytica</u>	2	4	6	8	9	10	11	12	14	16	18	18	18	18	18		
	<u>C. rugosa</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	3	3	6		
	<u>T. pullulans</u>	1	2	3	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
	<u>R. mucilaginoso</u>	-	-	-	1	2	3	5	6	8	9	10	11	13	14	19		
	<u>R. glutinis</u>	-	-	-	1	2	3	4	5	6	8	9	10	12	14	16		
5°C	<u>C. lipolytica</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	3	6		
	<u>C. zeylanoides</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	4		
	<u>T. magnolia</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	3		

Tableau 16: Récapitulation . Hydrolyse des tweens et de la tributyrine à la température ambiante (T°) et à 5°C. Les chiffres correspondent au diamètre maximum des auréoles.

Températures Levures	Tween 20		Tween 40		Tween 60		Tween 80		Tween 85		Tributyrine	
	5°C	T°	5°C	T°	5°C	T°	5°C	T°	5°C	T°	5°C	T°
<u>S. acidifaciens</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
<u>Saccharomyces sp</u>	-	-	-	5	-	-	-	-	-	3	-	5
<u>H. subpelliculosa</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<u>D. kloeckeri</u>	-	17	-	12	-	14	-	13	-	11	-	10
<u>D. subglobosus</u>	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<u>T. candida</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
<u>T. aerea</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<u>T. versatilis</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<u>T. magnolia</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	2
<u>C. melinii</u>	-	2	-	3	-	-	-	2	-	-	-	5
<u>C. zeylanoides</u>	4	-	3	-	3	-	3	-	3	-	4	6
<u>C. lipolytica</u>	5	16	4	15	4	15	4	15	3	14	6	18
<u>C. rugosa</u>	-	13	-	13	-	13	-	11	-	7	-	6
<u>T. pullulans</u>	-	3	-	3	-	-	-	2	-	-	3	5
<u>P. mucilaginoso</u>	-	23	-	22	-	18	-	17	-	17	-	19
<u>P. glutinis</u>	-	25	-	23	-	19	-	19	-	16	-	20

CHAPITRE V

INTERACTION

BACTERIES – LEVURES

BUNGAY (1968) a montré que certaines levures favorisaient la croissance des bactéries en libérant dans le milieu de culture des vitamines.

Afin de vérifier une éventuelle action de nos isolats, nous avons sélectionné Candida melinii qui est à la fois protéolytique et lipolytique et Rhodotorula mucilaginosa qui n'est que lipolytique mais qui contient des pigments caroténoides. Nous avons étudié leur influence sur deux groupes de bactéries particulièrement importantes :

- Les Streptocoques : indicateurs d'hygiène
- Les Coliformes : indicateurs de pollution fécale.

Cette action a été vérifiée en fonction de la température d'incubation.

MATERIEL ET METHODES

I. MILIEUX DE CULTURE.

Pour mettre en évidence les Streptocoques et les Coliformes nous avons utilisé les trois milieux de culture suivants :

a) Milieu de Rothe

Tryptone.....	20g	
Glucose.....	5g	
NaCl.....	5g	
$\text{PO}_4 \text{K}_2 \text{H}$	2,7g	pH:6,8
$\text{PO}_4 \text{KH}_2$	2,7g	
Azothhydrate de sodium..	(NaN_3) 0,2g	
Eau distillée.....	1000ml	

Nous avons réparti ce milieu à raison de 10ml par tube. Ces tubes ont été stérilisés à 120°C pendant 15 minutes.

b) Milieu de Litsky

La composition de ce milieu est la même que celle du milieu de Rothe, mais on y ajoute 0,3g d'azothhydrate de sodium et 5ml d'une solution à 0,01% de violet d'éthyle.

c) Milieu à la bile et au vert brillant.

Bile de boeuf déshydratée.....	20g	
Lactose.....	10g	
Peptone.....	10g	pH: 7,2
Vert brillant.....	0,013g	
Eau distillée.....	1000ml	

On répartit des quantités de 10ml dans des tubes et on ajoute une cloche de Durham, puis on stérilise à 120°C pendant 15 minutes.

II. CONDITIONS DE CULTURE

Les incubations ont été faites à 5°C, à la température ambiante et à 27°C pendant des périodes de 48 heures.

Des disques de viande de 1cm de diamètre ont été placés dans des boîtes de Pétri (6 par boîte). Leur surface a étéensemencée soit par C. melinii soit par R. mucilaginosa .

Après incubation, ces disques ont été pesés puis broyés pendant 4 minutes à 7.000t/mn (broyeur à palettes).

Nous avons ensuite préparé des dilutions allant de 10^{-2} à 10^{-8} . Avec chaque dilution nous avonsensemencé 3 tubes contenant du milieu de Rothe et 3 tubes contenant le milieu à la bile et au vert brillant.

Les tubes de Rothe sont gardés pendant 48 heures à 37°C . Les tubes positifs (troubles) sont utilisés pourensemencer le milieu de Litsky et confirmer la présence de Streptocoques. Les calculs sont faits à l'aide des tables de Mc Grady.

Les tubes contenant le milieu à la bile et au vert brillant sont conservés pendant 48 heures à 30°C afin que l'on puisse juger de l'existence et du nombre de coliformes par gramme de viande à l'aide des tables de Mc Grady.

Nous avons répété l'expérience deux fois. Dans chaque cas, nous avons utilisé de la viande de boeuf (Rumsteck) que nous avons achetée dans des magasins différents.

RESULTATS

I. Candida melinii

Nous présentons ici les résultats concernant l'influence de cette levure sur les Streptocoques et les Coliformes.

a) Action sur les Streptocoques (Tableau 17)

Nous avons pu constater que pour le même morceau de viande le nombre des Streptocoques variait énormément en fonction de la température : 900/g à 5°C à 7×10^5 /g à 27°C. Mais si cette différence est normale, on peut aussi observer une augmentation sensible lorsque la surface de la viande a étéensemencée avec C. melinii. Les écarts les plus importants s'observent toujours à 5°C : de 900/g à 7×10^3 /g pour le premier échantillon et 11×10^4 /g à 7×10^5 /g pour le deuxième.

Si à la température ambiante et à 27°C les différences sont moins importantes, on constate néanmoins que les chiffres obtenus en présence de levures sont toujours plus grands que dans le cas du témoin.

b) Action sur les Coliformes (Tableau 18)

La présence de C. melinii sur le milieu favorise la prolifération des Coliformes, mais uniquement à 5°C. Les différences observées à la température ambiante ou à 27°C sont négligeables ou nulles. Ces résultats sont confirmés par le deuxième essai.

Tableau I7 : Nombre de Streptocoques/g de viande en présence et en absence de C. melinii .

Traitement		5°C	T° ambiante	27°C
1 ^o Essai	Témoin	900	11×10^2	7×10^5
	Viande + levures	7×10^3	11×10^4	7×10^6
2 ^o Essai	Témoin	11×10^4	7×10^6	13×10^6
	Viande + levures	7×10^5	13×10^6	7×10^7

Tableau I8 : Nombre de Coliformes/g de viande en présence et en absence de C. melinii .

Traitement		5°C	T° ambiante	27°C
1 ^o Essai	Témoin	13×10^4	7×10^4	11×10^4
	Viande + levures	7×10^4	11×10^4	13×10^4
2 ^o Essai	Témoin	7×10^5	7×10^7	7×10^7
	Viande + levures	7×10^7	7×10^7	7×10^7

2. Rhodotorula mucilaginosa

a) Action sur les Streptocoques (Tableau I9)

Nous pouvons constater des résultats semblables à ceux obtenus avec C. melinii . La présence de cette levure favorise la prolifération des Streptocoques : 900/g dans le témoin et 13×10^3 /g en présence de R. mucilaginosa à 5°C, au cours du premier essai et 11×10^4 et 7×10^5 dans le deuxième essai.

Les différences sont encore une fois moins importantes dans le cas des deux autres températures.

b) Action sur les Coliformes (Tableau 20)

Nous retrouvons des résultats identiques à ceux obtenus avec les Streptocoques. La présence de R. mucilaginosa provoque aussi la prolifération des Coliformes.

CONCLUSIONS

L'ensemencement de levures (C. melinii et R. mucilaginosa) à la surface de blocs de viande et la recherche dans ces substrats des Streptocoques et des Coliformes après une certaine durée d'incubation , nous a semblé être la meilleure technique pour étudier l'influence de ces eucaryotes sur les bactéries.

La présence de ces germes semble surtout avoir une influence à 5°C, température du ^{re}frigidaire. Les nombres des Coliformes et des Streptocoques augmentent régulièrement et de façon importante. A température ambiante et à 27°C cette action est moins marquée et les différences sont nulles ou non suffisamment grandes pour que l'on puisse les considérer comme significatives.

Cette activité des levures peut revêtir une grande importance économique et hygiénique, en particulier lorsque les produits sont conservés trop longtemps à la température du réfrigérateur.

Tableau 19 : Nombre de Streptocoques/g de viande en présence et en absence de R. mucilaginosa.

Traitement		5°C	T° ambiante	27°C
1 ^o Essai	Témoin	900	11×10^2	7×10^5
	Viande + levures	13×10^3	7×10^5	7×10^6
2 ^o Essai	Témoin	11×10^4	7×10^6	13×10^6
	Viande + levures	7×10^5	13×10^6	7×10^7

Tableau 20 : Nombre de Coliformes/g de viande en présence et en absence de R. mucilaginosa .

Traitement		5°C	T° ambiante	27°C
1 ^o Essai	Témoin	13×10^3	7×10^4	11×10^4
	Viande + levures	13×10^4	7×10^5	11×10^5
2 ^o Essai	Témoin	7×10^5	7×10^7	7×10^7
	Viande + levures	7×10^7	7×10^7	7×10^7

CONCLUSIONS

Du fait qu'ils constituent encore la principale source de l'alimentation humaine, la dégradation microbiologique des produits carnés revêt une très grande importance.

Si la bactériologie des produits alimentaires est très avancée en particulier l'étude des espèces pathogènes, les champignons n'ont commencé à attirer l'attention des chercheurs de cette discipline qu'à partir de la découverte des aflatoxines. D'autre part, l'action directe ou indirecte de ces germes, leurs possibilités protéolytiques et lipolytiques, l'influence de ces germes sur les bactéries n'ont été que peu étudiés jusqu'à présent. C'est pourquoi nous avons décidé de rechercher les levures dans les produits à base de viande et de vérifier leur importance.

Il s'est avéré que plus de 50% des échantillons analysés contenaient des champignons à raison de 20 à 120.000/g. Nous avons identifié 16 espèces appartenant aux Endomycetaceae (Saccharomyces, Hansenula et Debaryomyces) et aux Cryptococcaceae (Torulopsis, Candida, Trichosporon et Rhodotorula) .

La contamination par ces eucaryotes se produit certainement au cours de la fabrication et elle trouve son origine dans les différents ingrédients ajoutés dans les produits carnés ainsi que dans le contact direct avec les manipulateurs.

Cette présence fréquente nous a décidé à étudier les possibilités de dégradation par ces germes, en particulier leur pouvoir de pénétration dans les protéines musculaires, action liée à la sécrétion de certaines enzymes. En utilisant différentes techniques nous avons pu constater que les levures ne pénétraient pas dans les viandes, mais l'utilisation du ^{14}C a mis en évidence une diffusion de produits provenant de ces germes. Cela laisse déjà supposer qu'une action à distance est possible.

Comme hypothèse de travail nous avons supposé que cette inaptitude à pénétrer dans les viandes était liée à une absence d'enzyme appropriée. Nous avons opéré à deux températures intéressant les consommateurs :

- 5°C température du frigidaire
- la température ambiante

C'est ainsi que nous avons mis en évidence une sécrétion d'enzymes protéolytique par Candida melinii, C. zeylanoides, Trichosporon pullulans et Torulopsis candida. Les espèces qui produisent des enzymes lipolytiques sont Rhodotorula glutinis, R. mucilaginosa et Debaryomyces hansenii. D'une manière générale, les levures isolées ne possèdent pas les deux types d'enzymes à la fois.

Malgré les résultats obtenus, certaines souches présentaient les conditions requises pour pénétrer dans les viandes. Cette inaptitude à entrer dans les muscles a été attribuée à la concurrence très vive de la part des bactéries ainsi qu'à l'émission d'ammoniac résultant de la dégradation des acides aminés. Cependant l'expérience avec le ^{14}C nous ayant prouvé la diffusion de certaines substances, il nous a paru évident que ces champignons influaient sur les modifications au cours du temps. C'est ainsi que la recherche des streptocoques et des coliformes en présence ou en absence de Candida melinii ou de Rhodotorula mucilaginosa nous a appris que le nombre de bactéries augmentait de façon sensible en présence des eucaryotes, en particulier à 5°C. Ceci peut être attribué à une action enzymatique à distance qui met à la disposition des procaryotes des quantités plus importantes d'aliments ou à la fourniture de substance de croissance (Rhodotorula est en effet une source de vitamine).

Dans ce substrat particulier que constituent les produits à base de viande, existent des associations microbiennes dont l'équilibre est modifié par la présence de champignons ou d'autres éléments. En tenant compte des facteurs ambiants, on pourra peut être aboutir à une meilleure conservation des produits carnés et ceci pour le plus grand bénéfice de l'homme.

D'autres expériences sont encore nécessaires pour couronner ce travail et nous espérons que, dans l'avenir, d'autres recherches nous permettront de définir l'importance exacte des levures et moisissures au cours de la détérioration des protéines musculaires.

RESUME

D'après nos expériences, plus de 50% des échantillons de viande ou de produits alimentaires à base de viande analysés contiennent des levures. Leur nombre varie entre 20 et $1,2 \times 10^5/g$. Sur 1037 isolats obtenus nous avons pu reconnaître 16 espèces appartenant à deux familles :

- Endomycetaceae : Saccharomyces, Hansenula et Debaryomyces.
- Cryptococcaceae : Torulopsis, Candida, Trichosporon et Rhodotorula.

Les espèces les plus fréquentes sont Candida melinii et Rhodotorula mucilaginosa .

Après avoir vérifié leur présence nous avons tenté, à l'aide de C. melinii et R. mucilaginosa , d'expliquer leur mode d'action sur les protéines du muscle de boeuf. Nous n'avons pas observé de pénétration des levures dans la viande par dépôt direct de ces germes sur le produit alimentaire. L'utilisation du ^{14}C nous a cependant permis de constater une diffusion de certaines substances libérée par ces eucaryotes. L'utilisation de la microscopie électronique à transmission nous a permis de constater cette absence de pénétration, mais aussi une augmentation du nombre des bactéries et une dégradation plus intense dans les blocs recouverts de levures.

Par la suite nous avons essayé d'expliquer cette activité en recherchant sur différents milieux de culture les possibilités protéolytiques et lipolytiques de ces germes. Sur les 16 souches isolées au départ, seules 4 espèces hydrolysent activement les protéines : Candida melinii, C. zeylanoides, Torulopsis candida et Trichosporon pullulans (Milieux à la gélatine, à la caséine et à la poudre acétonique de viande). Les levures émettant des lipases sont aussi en nombre réduit: Debaryomyces kloeckeri, Candida lipolytica , Rhodotorula glutinis et R. mucilaginosa . (Milieux aux tweens 20, 40, 60, 80 85 et à la tributyrine) Après des essais préliminaires, on est en droit de supposer que l'ammoniaque dégagé lors de la dégradation bactérienne des protéines joue un rôle important.

Nous avons enfin pu constater que la présence de C. melinii ou de R. mucilaginoso avait une action favorable sur le développement des Streptocoques ainsi que des Coliformes, en particulier à 5°C.

موجز :

نتيجة لقيامنا بتحليل أعداداً مختلفة من المواد الغذائية (لحم طازجة وصنعة) ، وجدنا على أكثر من نصف مجموع تلك العينات أعداداً من الخمائر تتراوح ما بين ٢٠ - ١٠٨١٢^٥ في الضام . بعد عزل تلك الخمائر وتصنيفها استمعنا تمييز ١٦ نوعاً تنتمي الى سبع اجناس ضمن عائلتيه :

- Endomycetaceae : Saccharomyces , Hansenula et Debaryomyces .
- Cryptococcaceae : Torulopsis , Candida , Trichosporon et Rhodotorula .

ومن دراستنا لأمكانية توغل أكثر الأنواع تردداً (C. melinii و R. mucilaginosa) على سطح عازل الأبقار بشكل مباشر ، حيث وجدنا النتيجة سلبية . بينما أثبتنا عن أمكانية تربية ونفاذية المواد التي تفرزها تلك الأنواع على الأنسجة المذكورة سابقاً بعد

استخدام الكربوه الطبع^{١٤} C أنه استعملنا للميكروسكوب الأليكتروني (M.E.T) أكد لنا عدم أفتراره تلك الخمائر ، بينما لاحظنا ترايداً في عدد البكتيريا مرافقاً لذلك تحلل مشد على الأجزاء التي تغطيها الخمائر .

عندئذ قمنا بدراسة تأثير كافة أنواع الخمائر السابقة على تحليل البروتين والدهون ، عن طريق إيجاد أوساط غذائية مناسبة ودوائية .

لاحظنا أنه هناك أربعة منحل وبشكل فعال البروتين (جيلاتين ، كازين ، وصوم اللحم اليتوني)

هم :

Candida melinii , C. zeylanoides ,
Torulopsis candida et Trichosporon
pullulans .

وأربعة أخرى محاللة للدهون أيضاً (Tween ٦٠، ٤٠، ٢٠، ١٠ و Tributyrine) هم :

Debaryomyces kloekeri و Candida lipolytica
Rhodotorula glutinis et R. mucilaginosa .
وذلة نتيجة لفرض مجموعات من الأنزيمات المحاللة لليباز
بروتينياز الخ .

ومن جراء تجارب أولية استطعنا معرفة الدور الذي
يلعبه اللاهوليك المتحرر بسبب تحلل البروتين بواسطة
البكتريا الخ .

وأخيراً تأكدنا أنه وهو (C. melinii و R.
mucilaginosa) يشجع من نمو و زيادة عدد البكتريا
مثل الستربتوكوك (Streptococcus) وكولي فورم
(Coliforms) بالأخص على درجة حرارة ٥٠م .

BIBLIOGRAPHIE

ABERLE E.D. , MERKEL R.A. (1966) - Solubility and electrophoretic behaviour of some proteins of postmortem aged bovine muscle .

J. Food Sci., 31 , 151.

ALGULNIK M., KORNESEV L. (1959) - Microbiology of meat and poultry.

Start publishing office of food.

ARCHIBALD K.M. (1946) - Determination of lipase activity.

J. Biol. Chem., 165 , 443-448.

BAIRD-PARKER A.C. (1962) - The occurrence and enumeration according to a new classification of micrococci and staphylococci in bacon and human and pig skin.

J. appl. Bact. , 25 , 352.

BARMAN T.E. (1974)- Enzyme handbook supplement.I.

Springer Verlag Berlin, 228 - 340.

BEECH F.W., DAVENPORT R.R., GOSWELL R.W., BURNETT J.K. (1968) - Two simplified schemes for identifying yeast cultures.

in GIBBS B.M. , SHAPTON D.A. , Identification methods for microbiologists, Academic Press , London, 151-175.

BENDALL R. (1969) - Muscles, molecules and movement (An assay in the contraction of muscle) Heinemann Educational Book LTD London, 205pp.

BOYER P.D., LARDY H. , MYRBACK K. (1960) - The enzyme.

Acad. Press, London, 4 , 1-10.

CAILLAT J.M. (1970) - Contribution à l'étude de la lipase du blé, isolement, caractéristiques de son action en milieux aqueux et peu hydratés.

Thèse Doct. Ing. Fac. Sci., Paris

CHAKRBARTY A.N. , ADHYA S. , PRMNIK M.K. (1970) - The hydrolysis of tween by vibrios and aeromonads. J. appl. Bact., 33 , 397 - 402.

CHAUDHRY H.M. , PARRISH F.C.J. , GOLL D.E. (1969) - Molecular preperation of postmortem muscle.6.Effect of temperature on protein solubility of rabbit and bovine muscle. J. Food Sci., 34 , 183.

CORP W.A., WINTER H. (1972) - Hydrolytic enzymes of some priphytic marine bacteria. Canad. J. Microbiol. , 18 , 1483 - 1490.

DAVEY C.L. , G LBERT K.V. (1968a) - Studies in meat tenderness . 4. Changes in the proteins during meat aging. J. Food Sci., 33 , 2.

DAVEY C.L. , GILBERT K.V. (1968 b) - Studies in meat tenderness. 6. The nature of myofibrillar protein extracted from meat during aging. J. Food Sci., 34 , 69.

DAVEY C.L. , GILBERT K.V. (1969) - Studies in meat tenderness. 7. Changes in the fine structure of meat during aging. J. Food Sci., 34 , 69.

DEMPSTER J.F. (1972) - Some characteristics of microorganisms isolated from vacuum packaged bacon. Arch. J. agric., 3 , 351 - 361.

DEVOYOD J.J. , DESMAZEAUD M. (1971) - Les associations microbienne dans le fromage de Roquefort. III. Action des enterocoques et des levures fermentant le lactose vis à vis des lactobacilles. Le lait 51 , 399-415.

DIXON M. , WEBB E.C. (1965) - Enzymes.

Longmans Green and CO Ltd, VI, 192 - 197.

DRAKE S.D., EVANS J.B., NIVEN C.F. (1958) - Microbial flora of packaged frankfurthers and their radiation resistance.

Food Res., 23 , 291-296.

DRAKE S.D. , EVANS J.B., NIVEN C.F. (1959) - The identity of yeasts in the surface of packaged frankfurter.

Food Res. , 24 , 243.

EDDY B.P. (1962) - Further studies on Aeromonas . I. Additional strains of supplementary biochemical tests.

J. appl. Bact., 25 , 137.

EDDY B.P. , CARPENTER K.P. (1964) - Further studies on Aeromonas . II. Taxonomy of Aeromonas and C27 strain.

J. appl. Bact. , 27 , 96.

EKLUND M.W. , SPINELLI J., MIYAUCHI D., DASSUW J. (1965) - Development of yeasts on irradiated pacific crab meat.

J. Food Sci., 31, 424 - 431.

ELMOSSALMI E. , WASSEF N. (1971) - Penetration of some microorganisms in meat.

Zbl Ved. Med.B. , 18 , 329-336.

FRAZIER W.C. (1958) - Food Microbiology. Ist Ed. Bailliere, Tindall et Co, London.

FOWWELL R.R. (1952) - Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeast.

Nature, London, 170 , 578

FUJIMAKI M. , OKITANI A., ARAKAWA N. (1965) - The changes of "Myosin B " during storage of rabbit muscle. I. Physico-chemical studies of Myosin B.

Agr. Biol. Chem., 29 , 581.

HADLOK R. (1972) - Mise en évidence et importance des moisissures et des levures dans les aliments.

Archiv. für Lebensmittelhygiene, 12 , 285 -286.

HENDERSON D.W., GOLL D.E., STROMER M.H. (1970) - A comparison of shortening and Z line degradation in postmortem bovine, porcine and rabbit muscle.

Am. J. Anat., 128 , 117

HUXLEY H.E. , BROWN W., HOLMES R.C. (1965) - Constancy of axial spacings in frog Sartorius muscle during contraction.

Nature, 208 , 1358.

IERCHE M., RIEVEL H. , GOERTTLER V. (1957) - Lehrbuch der Tierärztlichen Lebensmittelüberwachung.

Gustav Fischer Verlag, Yena.

JAYE M. , KITAKA R.B. , ORDAL J. (1962) - The effect of temperature and packaging material on the storage life and bacterial flora of ground beef.

Food Technology, 16 , 95 - 98.

JAY M. (1972) - Mechanism and detection of microbial spoilage in meats at low temperatures. A status report.

J. MilkFood Technol. , 35 , 467 - 471.

KRISHNASWAMY M.A. , PATEL J.D., PARTHASARTHY N. (1971) - Enumeration of micro-organisms in spices and spice mixtures.

J. Food Sci. Technol., 8 , 191-194.

LAVRIE R.A., PENNY I.F., SCOPES R.K., VOYLE C.A. (1963) -
Sarcoplasmic proteins in pale, exudative pig muscles.
Nature, 200 , 673.

LLYOD G.I., MORRIS E.D., SMITH J.F. (1971) - A study of the
esterases and their function in Candida lipolytica , Aspergillus
niger and a yeast-like fungus .
J. general Microbiol., 63 , 140 -151

LODDER J. (1971) - The yeasts. A taxonomic study.
North Holland Pub. Co, Amsterdam.

LYSENKO O. (1961) - Pseudomonas - an attempt at general
classification.
J. gen. Microbiol. , 25 , 379.

MALAKOV J.A. (1965) - Microbiology of meat and meat products.
Faculty of Medecine Veterinary, Egypt.

MANGENOT F. (1966) - Interactions nutritionnelles au niveau
de la feuille. Rapport général.
Ann. Inst. Pasteur, 3 , 329 - 341.

Mc INTOSH E.N. (1967) - Postmortem changes in protein
extractibility in beef, pork and chicken muscle.
J. Food Sci., 32 , 208.

de MIRANDA R. , DIEM H.G. (1974) - Deux nouvelles espèces de
levures isolées de la phyllosphère de l'orge.
Cand. J. Bot., 52 , 279- 282.

MRAK E.M. , BONAR L. (1939) - Film yeasts from pickle brines
Ztbl. Bakt. Parasit. Kde, 100 , 289 - 294.

MRAK E.M. , VAUGHN R.H., MILLER M.W., PHAFF H.J. (1956) -
Yeast occurring in brines during the fermentation and storage
of green olives.

Fd Technol. Champaign., 10 , 416 - 419

MOUREY A. , KILBERTUS G. (1975) - Simple media using stabilised
tributyryne for demonstrating bacteria in food and soil.

J. appl. Bact. (sous presse).

PANTALEON J. , ROSSET R. (1966) - Considérations sur la microbiolo-
gie des produits carnés conservés après conditionnement sous
pellicule plastique.

Ann. Inst. Pasteur, Lille, 137 -142.

PERNICE A. , ALONZO V. (1969) - Tween 85 come substrato adatto
por la valuzione delle lipasi batteriche.

Boll. Ist Sieroter Milanese, 48 , 132 - 136.

REUTER G. (1972) - Vorkommen und Bedeutung von psychrotrophen
Mikroorganismen im Fleish.

Arch. für Lebensmittelhygiene, 12 , 272 - 275.

ROECK - HOLTZHAUER Y.M. , PETIT F. (1970) - Revue de substrats
pour protéases.

J. de Pharm. de Biolog., 6 , 497 - 520.

SCHICKELE C. (1971) - Contribution à l'étude de la qualité
bactériologique des plats cuisinés.

Thèse de Pharmacie. Strasbourg.

SCOPES R.W. (1964) - The influence of postmortem conditions on the
solubilities of muscle protéins.

Biochem. J. ,91 , 201.

SIERRA G. (1957) - A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrats.

Antonie van Leewenhock, 23 , 15 -22.

STANIER R.Y. , PALLERONI N.J. , DOUDOROFF M. (1966) - The aerobic pseudomonads ; a taxonomic study.

J. Gen. Microbiol., 43 , 159 - 271

TARR H.L.A., SOUTHCOFF B.A., BISSET H.M. (1952) - Experimental preservation of flesh foods with antibiotics.

Food Technology, 6 , 363 -366.

TEST B.I. (1958) - Sanitary Microbiology. State publishing office of medical literature.

2nd Ed. Leningrad.

WALKER H.W. , AYRES J.C. (1959) - Yeasts as spoilage organisms.

Acad. Press, London, 464 -529

WELLS F.G., STADELMAN W.J. (1958) - Development of yeasts on antibiotic- treated poultry.

J. paper , 6 , 420-422.

WICKERHAM L.J. (1946) - A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts.

J. Bact., 52 , 293 - 301.

WICKERHAM L.J. (1948) - Carbon assimilation tests for the classification of yeasts.

J. Bact. , 56 , 363.

NOM DE L'ETUDIANT : ABOUKHEIR Saleh

NATURE DE LA THESE : DOCTEUR INGENIEUR

VU, APPROUVE

& PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 13/11/1975

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Helluy', with a large, sweeping flourish at the end.

J.R. HELLUY

